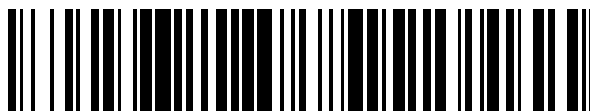


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 110**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07849385 .5**  
96 Fecha de presentación: **10.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2092339**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2009**

54 Título: **Dispositivo de sensor microelectrónico para detectar partículas de marcador**

30 Prioridad:  
**12.12.2006 EP 06125907**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.10.2012**

73 Titular/es:  
**KONINKLIJKE PHILIPS ELECTRONICS N.V.  
GROENEWOUDSEWEG 1  
5621 BA EINDHOVEN, NL**

72 Inventor/es:  
**VERSCHUREN, Coen Adrianus;  
BRULS, Dominique Maria;  
IMMINK, André Albert Hendrik Jan;  
DE THEIJE, Femke Karina;  
VAN DER WIJK, Thea;  
VAN DER LEE, Alexander Marc y  
SCHLEIPEN, Johannes Joseph Hubertina Barbara**

74 Agente/Representante:  
**Zuazo Araluze, Alexander**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 388 110 T3

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo de sensor microelectrónico para detectar partículas de marcador.

5 La invención se refiere a un dispositivo de sensor microelectrónico y a un método para la detección de componentes diana, por ejemplo moléculas biológicas, que comprenden partículas de marcador. Además, se refiere a un portador y una placa de pocillos que son particularmente adecuados para un dispositivo de sensor de este tipo.

10 El documento US 2005/0048599 A1 da a conocer un método para la investigación de microorganismos que se marcan con etiqueta con partículas de tal manera que puede ejercerse una fuerza (por ejemplo magnética) sobre ellos. En una realización de este método, se dirige un haz luminoso a través de un material transparente a una superficie en la que se refleja internamente de manera total. La luz de este haz que abandona el material transparente como una onda evanescente se dispersa mediante los microorganismos y/u otros componentes en la superficie y entonces se detecta mediante un fotodetector o se usa para iluminar los microorganismos para observación visual.

15 El documento GB-A-2065298 da a conocer un método y un aparato para detectar partículas biológicas mediante una señal inducida. Por tanto, se proporcionan tres partículas biológicas, de las que la tercera es un marcador fluorescente. El aparato tiene una fuente de luz que se usa para inducir emisión fluorescente a partir del sustrato que va a detectarse.

20 El documento WO9931486 da a conocer un biosensor de difracción óptico en el que se une un analito diana que puede dispersar luz en áreas seleccionadas de una película de plástico sobre la que se imprime un receptor. La difracción de la luz transmitida y/o reflejada se produce por medio de las dimensiones físicas, el índice de refracción y la colocación precisa, definida del analito.

La invención sólo se limita por sus reivindicaciones.

25 Basándose en esta situación, un objeto de la presente invención era proporcionar medios para una detección mejorada de componentes diana que comprenden partículas de marcador. En particular, se desea que el método sea sencillo y que su sensibilidad y/o precisión se mejore con respecto al estado de la técnica.

30 Este objeto se consigue mediante un dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1, un portador según la reivindicación 11, una placa de pocillos según la reivindicación 12, y un método según la reivindicación 14. Se dan a conocer realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

35 El dispositivo de sensor microelectrónico según la presente invención sirve para la detección cualitativa o cuantitativa de componentes diana que comprenden partículas de marcador, en el que los componentes diana pueden ser por ejemplo sustancias biológicas tales como biomoléculas, complejos, fracciones celulares o células. El término "partícula de marcador" debe indicar una partícula (átomo, molécula, complejo, nanopartícula, micropartícula, etc.) que tiene alguna propiedad (por ejemplo densidad óptica, susceptibilidad magnética, carga eléctrica, fluorescencia, radioactividad, etc.) que puede detectarse, revelando así indirectamente la presencia del componente diana asociado. El dispositivo de sensor microelectrónico comprende los siguientes componentes:

40 a) un portador con una superficie de unión en la que pueden recogerse componentes diana. El término "superficie de unión" se elige en este caso principalmente como una única referencia a una parte particular de la superficie del portador, y aunque los componentes diana se unirán realmente en muchas aplicaciones a dicha superficie, este no tiene por qué ser necesariamente el caso. Todo lo que se requiere es que los componentes diana puedan alcanzar la superficie de unión para recogerlos allí (normalmente en concentraciones determinadas por parámetros asociados a los componentes diana, a su interacción con la superficie de unión, a su movilidad y similares). El portador debe tener una alta transparencia para la luz de un intervalo espectral dado, particularmente la luz emitida por la fuente de luz que se definirá a continuación. El portador puede producirse por ejemplo a partir de vidrio o algún plástico transparente.

45 b) Una fuente de luz para emitir un haz luminoso, denominado "haz luminoso de entrada" a continuación, al interior del portador mencionado anteriormente de tal manera que se refleja internamente de manera total en una zona de investigación en la superficie de unión del portador. La fuente de luz puede ser por ejemplo un láser o un diodo emisor de luz (LED), dotado opcionalmente de alguna óptica para conformar y dirigir el haz luminoso de entrada. La "zona de investigación" puede ser una subzona de la superficie de unión o comprender la superficie de unión completa; tendrá normalmente la forma de un punto sustancialmente circular que se ilumina mediante el haz luminoso de entrada. Además, debe observarse que la aparición de reflexión interna total requiere que el índice de refracción del portador sea mayor que el índice de refracción del material adyacente a la superficie de unión. Este es el caso por ejemplo si el portador se fabrica de vidrio ( $n = 1,6$ ) y el material adyacente es agua ( $n = 1,3$ ). Debe observarse además que el término "reflexión interna total" debe incluir el caso denominado "reflexión interna total frustrada", en el que se pierde algo de la luz incidente (se absorbe, se dispersa, etc.) durante el procedimiento de reflexión.

c) un detector de luz para determinar la cantidad de luz en un “haz luminoso de salida”, que comprende la luz que proviene de la reflexión interna total mencionada anteriormente del haz luminoso de entrada. No es necesario que el haz luminoso de salida comprenda toda la luz reflejada internamente de manera total (aunque este será preferiblemente el caso), ya que algo de esta luz puede usarse por ejemplo para otros fines o simplemente perderse, o que consista completamente en luz reflejada internamente de manera total, ya que puede también comprender por ejemplo luz dispersada o luz de fluorescencia.

El detector puede comprender cualquier sensor o pluralidad de sensores adecuados mediante los que puede detectarse luz de un espectro dado, por ejemplo un fotodiodo, un fotoresistor, una fotocélula, un chip CCD o un tubo fotomultiplicador.

El dispositivo de sensor microelectrónico descrito permite una detección cuantitativa o cualitativa sensible y precisa de componentes diana en una zona de investigación en la superficie de unión. Esto es debido al hecho de que el haz luminoso de entrada reflejado internamente de manera total genera una onda evanescente que se extiende desde la superficie de portador una corta distancia hasta el interior del material adyacente. Si la luz de esta onda evanescente se dispersa o absorbe mediante las partículas de marcador unidas a los componentes diana presentes en la superficie de unión, faltará en el haz luminoso de salida. La cantidad de luz en el haz luminoso de salida (más precisamente la cantidad de luz que falta en el haz luminoso de salida cuando se compara con el haz luminoso de entrada) es por tanto una indicación de la presencia y la cantidad de partículas de marcador en la superficie de unión. Una ventaja del procedimiento de detección óptica descrito comprende su precisión ya que las ondas evanescentes exploran sólo un volumen pequeño de normalmente 10 a 300 nm de espesor directamente por encima de la superficie de unión, evitando así alteraciones del material a granel detrás de este volumen. Se logra una alta sensibilidad cuando se mide la luz reflejada ya que se detectan todos los efectos que reducen la cantidad de luz reflejada internamente de manera total. Además, la detección óptica puede realizarse opcionalmente desde una distancia, es decir sin contacto mecánico entre el portador y la fuente de luz o detector de luz.

El dispositivo de sensor microelectrónico puede diseñarse particularmente de tal manera que se frustra el haz luminoso reflejado internamente de manera total dando como resultado una disminución de la intensidad de luz reflejada internamente de manera total cuando las partículas de marcador que están unidas a los componentes diana son partículas de dispersión y/o absorción macroscópicas.

En una realización preferida de la invención, el dispositivo de sensor microelectrónico comprende un generador de campo para generar un campo magnético y/o eléctrico que puede afectar a las partículas de marcador. El generador de campo puede realizarse por ejemplo mediante un imán permanente, un alambre, un par de electrodos o una bobina. El campo generado puede afectar a las partículas de marcador por ejemplo induciendo una magnetización o una polarización y/o ejerciendo fuerzas sobre ellas. Un dispositivo de sensor microelectrónico de este tipo permite una manipulación versátil de componentes diana por medio de campos, que pueden usarse por ejemplo para acelerar la recogida de componentes diana en la superficie de unión y/o para retirar componentes (desprendidos o, en una prueba de rigurosidad, unidos débilmente) no deseados de la superficie de unión.

En el caso general, el espacio próximo al portador en el lado de la superficie de unión puede diseñarse arbitrariamente. Es posible por ejemplo que este espacio sea exterior al dispositivo de sensor microelectrónico y que se apliquen componentes diana a la superficie de unión mediante pulverización o pintando; el espacio puede abrirse también al entorno para detectar componentes diana por ejemplo en la atmósfera ambiental. Además, es posible que los componentes diana alcancen la superficie de unión a través del portador, por ejemplo mediante difusión. En realizaciones preferidas de la invención, el dispositivo de sensor microelectrónico comprende sin embargo una cámara de muestra que se ubica adyacente a la superficie de unión y en la que puede proporcionarse una muestra con componentes diana. La cámara de muestra es normalmente una cavidad vacía o una cavidad llena con alguna sustancia como un gel que puede absorber una sustancia de muestra; puede ser una cavidad abierta, una cavidad cerrada o una cavidad conectada a otras cavidades mediante canales de conexión de fluido.

Tal como ya se ha mencionado, el dispositivo de sensor microelectrónico puede usarse para una detección cualitativa de componentes diana, produciendo por ejemplo una respuesta binaria simple con respecto a una molécula diana particular (“presente” o “no presente”). Preferiblemente el dispositivo de sensor comprende sin embargo un módulo de evaluación para determinar cuantitativamente la cantidad de componentes diana en la zona de investigación a partir del haz luminoso de salida detectado. Esto puede basarse por ejemplo en el hecho de que la cantidad de luz en una onda de luz evanescente, que se absorbe o dispersa mediante las partículas de marcador, es proporcional a la concentración de los componentes diana unidos a las partículas de marcador en la zona de investigación. La cantidad de componentes diana en la zona de investigación puede ser indicativa a su vez de la concentración de estos componentes en un fluido de muestra adyacente según la cinética de los procedimientos de unión relacionados.

En un desarrollo adicional de la realización mencionada anteriormente, el dispositivo de sensor microelectrónico comprende un módulo de registro para monitorizar la cantidad determinada de luz en el haz luminoso de salida a lo largo de un periodo de observación. Por tanto será posible monitorizar la cinética con la que se recogen o se apartan componentes diana de la superficie de unión. Esto puede revelar información valiosa sobre los componentes diana

y/o las condiciones ambientales reinantes. El módulo de evaluación y/o el módulo de registro están acoplados normalmente al detector de luz y pueden realizarse mediante algún hardware de procesamiento de datos, por ejemplo un microordenador, junto con el software asociado.

5 Hasta ahora la descripción del dispositivo de sensor microelectrónico incluía el caso en el que sólo una única zona de investigación está presente sobre la superficie de unión. A continuación, se considerarán diversas realizaciones del dispositivo de sensor microelectrónico en las que el portador comprende una pluralidad de zonas de investigación en las que pueden reflejarse internamente de manera total haces luminosos de entrada diferentes. Un portador permite entonces el procesamiento de diversas zonas de investigación y por tanto por ejemplo la búsqueda de componentes diana diferentes, la observación de los mismos componentes diana en condiciones diferentes y/o la toma de muestras de diversas mediciones para fines estadísticos. Los "haces luminosos de entrada diferentes" pueden ser opcionalmente componentes de un haz luminoso ancho que se genera de manera homogénea mediante la fuente de luz.

15 Los haces luminosos de entrada diferentes que se usan en la realización mencionada anteriormente pueden ser diferentes con respecto al tiempo. Este es el caso por ejemplo si el dispositivo de sensor microelectrónico comprende un módulo de barrido para acoplar secuencialmente la fuente de luz a zonas de investigación diferentes. Alternativa o adicionalmente, puede comprender un módulo de barrido para acoplar ópticamente el detector de luz a zonas de investigación diferentes sobre la superficie de unión. Los módulos de barrido pueden comprender por ejemplo componentes ópticos tales como lentes o espejos para dirigir el haz luminoso incidente o de salida de una manera adecuada. Los módulos de barrido también pueden comprender medios para mover el portador con respecto a la fuente de luz y/o detector de luz.

25 En otra realización del dispositivo de sensor microelectrónico con una pluralidad de zonas de investigación, está presente una pluralidad de fuentes de luz y/o una pluralidad de detectores de luz que se dirigen a zonas de investigación diferentes en la superficie de unión. En este caso es posible procesar una pluralidad de zonas de investigación simultáneamente, acelerando así en consecuencia el procedimiento de medición asociado. Esta realización puede evidentemente combinarse con la anterior, es decir puede haber por ejemplo un módulo de barrido para barrer los haces luminosos de entrada de una pluralidad de fuentes de luz en redes diferentes de zonas de investigación y/o un módulo de barrido para dirigir los haces luminosos de salida desde redes diferentes de zonas de investigación hasta una pluralidad de detectores de luz. Usando módulos de barrido, el número de fuentes/detectores de luz puede mantenerse menor que el número de zonas de investigación.

35 En otra realización con una pluralidad de zonas de investigación, el dispositivo de sensor microelectrónico comprende una pluralidad de generadores de campo (magnético o eléctrico) controlables individualmente que están asociados a zonas de investigación diferentes. En este caso es posible manipular las partículas de marcador en cada zona de investigación individualmente según los requisitos de las pruebas particulares que deben realizarse ahí.

40 El dispositivo de sensor microelectrónico puede usarse en principio con cualquier tipo de partículas de marcador. Sin embargo está dotado preferiblemente de partículas de marcador que se ajustan específicamente a los otros componentes del dispositivo. El dispositivo de sensor puede comprender especialmente partículas de marcador con un manto de un material transparente, en el que este manto normalmente cubre (completa o parcialmente) uno o más granos de otro material, por ejemplo granos de óxido de hierro. En este caso la luz de una onda de luz evanescente en la superficie de unión puede entrar fácilmente en las partículas de marcador en las que se absorbe y/o dispersa y por tanto se pierde para el haz luminoso de salida. El material transparente del manto puede ser particularmente un material con un índice de refracción similar al del material del portador, porque esto optimiza la transición de luz desde el portador hasta las partículas de marcador. El manto puede consistir por ejemplo en el mismo material que el portador.

50 El dispositivo de sensor microelectrónico puede comprender opcionalmente un "segundo detector de luz" para determinar (cualitativa o cuantitativamente) luz de fluorescencia emitida por los componentes diana en la superficie de unión. La fluorescencia puede estimularse mediante la onda evanescente del haz luminoso de entrada en un volumen pequeño adyacente a la superficie de unión y entonces detectarse, indicando por tanto la presencia (y la cantidad) de componentes diana fluorescentes.

60 En otra realización de la invención, el dispositivo de sensor microelectrónico comprende un sensor de monitorización de luz de entrada para determinar la cantidad de luz en el haz luminoso de entrada. Esto permite tener en cuenta dicha cantidad durante una evaluación (cuantitativa) de las mediciones del haz luminoso de salida y/o controlar el haz luminoso de entrada en un lazo de retroalimentación.

El sensor de monitorización de luz de entrada puede integrarse en la fuente de luz, lo que proporciona un diseño robusto y compacto y que es favorable para una integración en un lazo de control de retroalimentación. Alternativamente, el sensor de monitorización de luz de entrada (o al menos una parte del mismo) puede disponerse fuera de la fuente de luz como un componente independiente. La última disposición tiene la ventaja de que la medición de este sensor puede centrarse mejor en el haz luminoso de entrada real a medida que entra en el

portador porque la medición de monitorización tiene lugar detrás de elementos ópticos como lentes o agujeros puntuales que están presentes normalmente en la trayectoria de luz de la fuente de luz.

Ya se ha mencionado que la medición que resulta del sensor de monitorización de luz de entrada puede estar relacionada con la cantidad de luz en el haz luminoso de salida que se determina mediante el detector de luz. El dispositivo de sensor microelectrónico puede comprender por tanto un módulo de evaluación que está adaptado para ejecutar una relación de este tipo. Con este fin, el módulo de evaluación está dotado normalmente de señales a partir del sensor de monitorización de luz de entrada y el detector de luz que representan las cantidades determinadas de luz. El módulo de evaluación puede preprocesar opcionalmente estas señales, por ejemplo someterlas a filtrado (de paso bajo). En una realización preferida, la cantidad de luz en el haz luminoso de salida se normaliza mediante la cantidad de luz en el haz luminoso de entrada, haciendo que el resultado sea independiente de variaciones en la potencia de la fuente de luz.

Según otra realización de la invención, la fuente de luz está adaptada para generar un haz luminoso de entrada polarizado, particularmente un haz luminoso de entrada polarizado linealmente. En un haz luminoso polarizado, los vectores del campo eléctrico (y por tanto también del campo magnético asociado) no están orientados aleatoriamente en el plano perpendicular a la dirección de propagación del haz luminoso sino que tienen una orientación regular. Esta orientación es constante en el espacio para un haz luminoso polarizado linealmente y gira de una manera regular para un haz luminoso polarizado de manera circular o de manera elíptica. Generar un haz luminoso de entrada con una polarización le proporciona un rasgo interno característico que afecta a la interacción de este haz con otras entidades, por ejemplo con componentes ópticos en la trayectoria de luz o con partículas diana que van a detectarse. Esto abre muchas posibilidades que pueden aprovecharse favorablemente, por ejemplo la posibilidad de distinguir la luz en el haz luminoso de salida que procede del haz luminoso de entrada de luz de otras fuentes, por ejemplo el entorno.

En una realización preferida de la realización mencionada anteriormente, el haz luminoso de entrada tiene una polarización lineal en el plano de incidencia con respecto a una ventana de entrada del portador en la que el haz luminoso de entrada entra en el portador. Adicional o alternativamente, el haz luminoso de salida puede tener una polarización lineal en el plano de incidencia con respecto a una ventana de salida del portador en la que el haz luminoso de salida abandona el portador. Como es habitual, el "plano de incidencia" de un haz luminoso se refiere al plano que comprende dicho haz luminoso y que es perpendicular a la superficie sobre la que incide dicho haz luminoso. Cuando un haz luminoso incide sobre una superficie del portador, una fracción (pequeña) de su luz se reflejará habitualmente. Además del hecho de que esta luz se pierda para otros fines, una desventaja particular de una reflexión de este tipo es que puede perturbar a otros componentes, por ejemplo el detector de luz o un láser en la fuente de luz. Por tanto es deseable reducir la cantidad de luz que se refleja en la ventana de entrada o de salida del portador. Es posible una reducción de este tipo con la configuración propuesta en la que el haz luminoso de entrada y/o el haz luminoso de salida tienen la polarización explicada.

En una realización preferida de la invención, la ventana de entrada a través de la cual el haz luminoso de entrada entra en el portador se coloca a un ángulo de Brewster con respecto al haz luminoso de entrada y/o la ventana de salida a través de la cual el haz luminoso de salida abandona el portador se coloca a un ángulo de Brewster con respecto al haz luminoso de salida. Tal como se conoce bien a partir de la óptica, un haz reflejado desaparece si un haz luminoso incidente con una polarización lineal en el plano de incidencia incide sobre una superficie a un ángulo de Brewster correspondiente. Si esta realización se combina con la mencionada anteriormente (que tiene un haz luminoso de entrada polarizado linealmente), las reflexiones en la ventana de entrada o de salida del portador pueden suprimirse completamente. El ángulo de Brewster para una configuración particular puede calcularse a partir del hecho de que, al ángulo de Brewster de incidencia, hay un ángulo de  $90^\circ$  entre el haz luminoso refractado y la dirección del haz luminoso reflejado (suprimido).

La invención se refiere además a un portador para proporcionar una muestra que va a investigarse, siendo dicho portador adecuado como un portador para un dispositivo de sensor microelectrónico del tipo descrito anteriormente. El portador comprende una cámara de muestra en la que puede proporcionarse una muestra y que tiene una pared de inspección transparente. La pared de inspección tiene en su lado interior una superficie de unión en la que pueden recogerse componentes de una muestra. En su lado exterior, la pared de inspección tiene al menos una estructura óptica que está diseñada de tal manera que

(i) un haz luminoso de entrada que se dirige desde fuera del portador sobre la estructura óptica entra en la pared de inspección,

(ii) dicho haz luminoso de entrada se refleja internamente de manera total (al menos una vez) en una zona de investigación en la superficie de unión,

(iii) el haz luminoso reflejado internamente de manera total se frustra dando como resultado una disminución de la intensidad de luz reflejada internamente de manera total cuando las partículas de marcador son partículas de dispersión y/o absorción macroscópicas, y

(iv) un haz luminoso de salida que comprende al menos algo de la luz reflejada internamente de manera total y/o luz de fluorescencia emitida por los componentes diana en la superficie de unión abandona la pared de inspección a través de la estructura óptica, preferiblemente en una dirección alejándose del portador.

La pared de inspección tendrá normalmente la forma básica de una placa con una superficie interior y exterior sustancialmente paralelas, en la que la superficie interior comprende la superficie de unión y en la que la estructura óptica sobresale hacia fuera de la superficie exterior. Además, la pared de inspección puede ser en principio cualquier parte de la pared de la cámara de muestra, por ejemplo una pared lateral o la parte superior. Sin embargo, preferiblemente, la pared de inspección es una parte del fondo del portador (o todo el fondo), lo que tiene dos ventajas: en primer lugar, los componentes de muestra que experimentan sedimentación se concentrarán en la superficie de unión del fondo. En segundo lugar, los componentes de un instrumento asociado pueden disponerse por debajo de dicho fondo, dejando por tanto espacio en los lados del portador para una posible disposición de portadores adicionales.

El portador descrito tiene la ventaja de que una muestra de dentro de su cámara de muestra puede investigarse de manera óptica con un haz luminoso de entrada que se refleja internamente de manera total, proporcionando así un campo evanescente en un volumen pequeño en la superficie de unión. Efectos tales como la absorción o la dispersión que tienen lugar en este volumen pequeño afectarán al haz luminoso de salida que abandona el portador. Adicionalmente, puede estimularse fluorescencia mediante la onda evanescente en componentes diana fluorescentes y proporcionar así un indicador adicional para la diana. Dado que tanto el haz luminoso de entrada como el haz luminoso de salida se dirigen desde el exterior hacia el portador o viceversa, la fuente de luz y el detector de luz correspondientes pueden disponerse a una distancia alejada y separada del portador.

La invención se refiere además a una placa de pocillos que comprende una pluralidad de portadores del tipo descrito anteriormente, es decir una pluralidad de cámaras de muestras con paredes de inspección transparentes que tienen en su lado interior una superficie de unión y en su lado exterior al menos una estructura óptica, en la que dicha estructura óptica permite que un haz luminoso de entrada que viene desde fuera del portador entre en la pared de inspección, se refleje internamente de manera total en la superficie de unión y después abandone la pared de inspección como un haz luminoso de salida que se dirige alejándose del portador.

La placa de pocillos combina una pluralidad de los portadores descritos anteriormente en una red y por tanto permite una investigación paralela de una multitud de muestras y/o de una muestra en una multitud de ensayos de investigación. Como la placa de pocillos se basa en el portador descrito, se hace referencia a la descripción anterior para más detalles sobre las ventajas, rasgos y mejoras de dicha placa de pocillos.

A continuación se describirán diversas realizaciones de la invención que pueden aplicarse a un dispositivo de sensor microelectrónico, un portador y una placa de pocillos del tipo descrito anteriormente.

Aunque es posible en principio que el portador tenga alguna estructura dedicada con múltiples componentes de materiales diferentes, se prefiere que el portador se fabrique homogéneamente a partir de un material transparente, por ejemplo un plástico transparente. El portador puede producirse por tanto fácilmente por ejemplo mediante moldeo por inyección.

La zona de investigación del portador tiene preferiblemente una rugosidad baja con el fin de minimizar influencias no deseadas sobre la reflexión interna total (frustrada). Siendo  $\lambda$  una longitud de onda característica (por ejemplo máxima o promedio) de la luz que constituye el haz luminoso de entrada, la rugosidad de la zona de investigación es preferiblemente inferior a  $0,5 \lambda$ , más preferiblemente inferior a  $0,1 \lambda$  (lo que significa que la diferencia de altura entre "valles" y "puntas" microscópicos de la superficie de portador en la zona de investigación es menor que estos valores).

La zona de investigación del portador puede cubrirse opcionalmente con al menos un tipo de elemento de captura que puede unirse a uno o más componentes diana. Un ejemplo típico de un elemento de captura de este tipo es un anticuerpo al que pueden unirse específicamente los antígenos correspondientes. Dotando la zona de investigación de elementos de captura que son específicos para ciertos componentes diana, es posible enriquecer selectivamente estos componentes diana en la zona de investigación. Además, pueden retirarse componentes diana no deseados de la superficie de unión mediante fuerzas de repulsión (por ejemplo magnéticas) adecuadas (que no rompen las uniones entre elementos de captura y componentes diana deseados). La superficie de unión puede estar dotada preferiblemente de diversos tipos de elementos de captura que son específicos para componentes diana diferentes. En un dispositivo de sensor microelectrónico con una pluralidad de zonas de investigación, hay preferiblemente al menos dos zonas de investigación que tienen elementos de captura diferentes de tal manera que estas zonas son específicas para componentes diana diferentes.

Según otra realización de la invención, la superficie del portador es sustancialmente perpendicular al haz luminoso de entrada y/o al haz luminoso de salida en la ventana de entrada o ventana de salida en la que este haz entra o abandona el portador, respectivamente, es decir el ángulo de incidencia se encuentra en un intervalo de aproximadamente  $\pm 5^\circ$  alrededor de  $90^\circ$ . En este caso la dirección del haz luminoso de entrada y/o el haz luminoso

de salida no cambiará o sólo cambiará mínimamente durante la transición desde un medio circundante al interior del portador o viceversa. Además, se minimizará la reflexión. Adicional o alternativamente, las zonas correspondientes también pueden tener un recubrimiento anti-reflexión. Para evitar la retroalimentación óptica al interior de la fuente de luz (por ejemplo un láser), puede ser preferible tener el haz incidente desviado (como máximo) algunos grados de la perpendicular.

El portador puede comprender particularmente al menos una superficie con una forma similar o idéntica a un hemisferio o una pirámide truncada. Tal como se tratará en más detalle con referencia a las figuras, estas formas funcionan como lentes y/o prismas y por tanto proporcionan una guía favorable del haz luminoso incidente y de salida.

El portador puede comprender además opcionalmente una cavidad en la que puede disponerse al menos parcialmente un generador de campo (magnético o eléctrico). La fuente del campo puede ubicarse por tanto tan cerca como sea posible de la superficie de unión, permitiendo generar altas fuerzas de campo en la zona de investigación con el mínimo esfuerzo (por ejemplo corrientes eléctricas) y con alteraciones mínimas para otras zonas (por ejemplo zonas de investigación circundantes). Además, una cavidad de este tipo puede usarse para centrar el portador con respecto al generador de campo, la fuente de luz y el detector de luz.

Aunque el dispositivo de sensor microelectrónico puede construirse en principio como una unidad de "una pieza" de componentes montados sólidamente, se prefiere que el portador esté diseñado como un componente intercambiable del dispositivo, por ejemplo una placa de pocillos. Por tanto puede usarse como una pieza desechable de bajo coste, lo que es particularmente útil si entra en contacto con muestras biológicas y/o si su recubrimiento (por ejemplo con anticuerpos) se agota durante un procedimiento de medición.

La invención se refiere además a un método para la detección de componentes diana que comprenden partículas de marcador, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) Recoger componentes diana en la superficie de unión de un portador.

b) Dirigir un haz luminoso de entrada al interior del portador de tal manera que se refleja internamente de manera total en una zona de investigación en la superficie de unión.

c) Determinar la cantidad de luz en un haz luminoso de salida que comprende al menos algo de la luz reflejada internamente de manera total del haz luminoso de entrada; preferiblemente el haz luminoso de salida comprende sólo tal luz reflejada internamente de manera total.

El método comprende de forma general las etapas que pueden ejecutarse con un dispositivo de sensor microelectrónico del tipo descrito anteriormente. Por tanto, se hace referencia a la descripción anterior para más información sobre los detalles, ventajas y mejoras de ese método.

En una realización del método, las partículas de marcador se manipulan mediante un campo magnético y/o eléctrico, en el que esta manipulación puede comprender particularmente la atracción de las partículas a, o su repulsión de, la zona de investigación.

En otra realización del método, la cantidad de luz en el haz luminoso de entrada se mide y se relaciona con la cantidad medida de luz en el haz luminoso de salida. Por tanto pueden detectarse variaciones en la intensidad del haz luminoso de entrada y usarse para corregir por ejemplo la cantidad medida de luz en el haz luminoso de salida, haciendo que el resultado sea independiente de las fluctuaciones de luz de entrada.

Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes a partir de, y se aclararán con referencia a, la(s) realización/realizaciones descrita(s) a continuación en el presente documento. Estas realizaciones se describirán a modo de ejemplo con la ayuda de los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 muestra esquemáticamente la configuración general de un dispositivo de sensor microelectrónico según la presente invención;

la figura 2 muestra los ángulos de incidencia cuando el haz luminoso de entrada y el haz luminoso de salida están orientados a un ángulo de Brewster;

la figura 3 muestra un dispositivo de sensor microelectrónico con un pocillo que tiene un fondo esférico;

la figura 4 muestra el diseño de la figura 3 con medios adicionales para enfocar un haz de luz;

la figura 5 muestra un pocillo que tiene una pluralidad de hemisferios en el fondo;

la figura 6 muestra un pocillo que tiene un fondo en forma de una pirámide truncada;

la figura 7 muestra el diseño de la figura 6 con una cavidad para un electroimán;

la figura 8 es un diagrama que muestra una señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para disoluciones con concentraciones diferentes de morfina marcadas con partículas magnéticas;

la figura 9 es un diagrama que muestra una señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para disoluciones que contienen morfina marcada con partículas magnéticas y concentraciones diferentes de morfina libre;

la figura 10 ilustra la formación de pilares de perlas magnéticas en un campo magnético;

la figura 11 es un diagrama que muestra una señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para disoluciones con concentraciones diferentes de morfina marcadas con partículas magnéticas cuando sólo se aplica una etapa de atracción magnética;

la figura 12 es un diagrama que muestra una señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para disoluciones que contienen saliva y morfina marcada con partículas magnéticas;

la figura 13 es un diagrama que muestra una señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para un ensayo PTH de dos etapas en comparación con una disolución que no contiene PTH;

la figura 14 muestra una curva de respuesta a la dosis para PTH en tampón para la detección óptica;

la figura 15 es un diagrama como el de la figura 13 para concentraciones diferentes de PTH;

la figura 16 muestra una curva de respuesta a la dosis para PTH en tampón y en sangre para la detección óptica;

la figura 17 muestra una curva respuesta a la perla para la detección con un sensor GMR;

la figura 18 muestra una curva de respuesta a la perla para la detección óptica.

Los números de referencia similares o números que difieren en múltiplos enteros de 100 se refieren en las figuras a componentes idénticos o similares.

La figura 1 muestra la configuración general de un dispositivo de sensor microelectrónico según la presente invención. Un componente central de este dispositivo es el portador 11 que puede fabricarse por ejemplo de vidrio o plástico transparente tal como poliestireno. El portador 11 está ubicado próximo a una cámara 2 de muestra en la que puede proporcionarse un fluido de muestra con componentes diana que van a detectarse (por ejemplo drogas, anticuerpos, ADN, etc.). La muestra comprende además partículas 1 magnéticas, por ejemplo perlas superparamagnéticas, en la que estas partículas 1 se unen habitualmente como marcadores a los componentes diana mencionados anteriormente (por simplicidad sólo se muestran las partículas 1 magnéticas en la figura).

La superficie de contacto entre el portador 11 y la cámara 2 de muestra está formada por una superficie denominada "superficie 12 de unión". Esta superficie 12 de unión puede recubrirse opcionalmente con elementos de captura, por ejemplo anticuerpos, que pueden unirse específicamente a los componentes diana.

El dispositivo de sensor comprende un generador 41 de campo magnético, por ejemplo un electroimán con una bobina y un núcleo, para generar de manera controlada un campo  $B$  magnético en la superficie 12 de unión y en el espacio adyacente de la cámara 2 de muestra. Con la ayuda de este campo  $B$  magnético, las partículas 1 magnéticas pueden manipularse, es decir magnetizarse y moverse particularmente (si se usan campos magnéticos con gradientes). Por tanto es posible por ejemplo atraer partículas 1 magnéticas a la superficie 12 de unión para acelerar la unión del componente diana asociado a dicha superficie.

El dispositivo de sensor comprende además una fuente 21 de luz, por ejemplo un láser o un LED, que genera un haz  $L1$  de luz de entrada que se transmite al interior del portador 11. El haz  $L1$  de luz de entrada llega a la superficie 12 de unión con un ángulo mayor que el ángulo  $\theta_c$  crítico de reflexión interna total (TIR) y por tanto se refleja internamente de manera total como un "haz  $L2$  de luz de salida". El haz  $L2$  de luz de salida abandona el portador 11 a través de otra superficie y se detecta mediante un detector 31 de luz, por ejemplo un fotodiodo. El detector 31 de luz determina la cantidad de luz del haz  $L2$  de luz de salida (por ejemplo expresado mediante la intensidad de luz de este haz de luz en todo el espectro o una cierta parte del espectro). Los resultados de la medición se evalúan y se monitorizan opcionalmente a lo largo de un periodo de observación mediante un módulo 32 de evaluación y registro que está acoplado al detector 31.

En la fuente 21 de luz, puede usarse un diodo láser DVD comercial ( $\lambda = 658 \text{ nm}$ ). Puede usarse una lente colimadora para hacer que el haz  $L1$  de luz de entrada sea paralelo, y puede usarse un agujero 23 puntual de por ejemplo  $0,5 \text{ mm}$  para reducir el diámetro de haz. Para mediciones con precisión, se requiere una fuente de luz



altamente estable. Sin embargo, incluso con una fuente de alimentación perfectamente estable, los cambios de temperatura en el láser pueden provocar desviación y cambios aleatorios en la salida.

Para tratar este problema, la fuente de luz puede tener opcionalmente un diodo 22 de monitorización de luz de entrada integrado para medir el nivel de salida del láser. La salida (sometida a filtro de paso bajo) del sensor 22 de monitorización puede entonces acoplarse al módulo 32 de evaluación que puede dividir la señal óptica (sometida a filtro de paso bajo) del detector 31 entre la salida del sensor 22 de monitorización. Para una relación señal a ruido mejorada, puede calcularse el promedio de la señal resultante en el tiempo. La división elimina el efecto de fluctuaciones de salida de láser debido a variaciones de potencia (no se necesita una fuente de alimentación estabilizada) así como desviación de temperatura (no se necesitan precauciones como los elementos Peltier).

Puede conseguirse una mejora adicional si no (o no sólo) se mide la propia salida de láser, sino la salida final de la fuente 21 de luz. Tal como ilustra toscamente la figura 1, sólo una fracción de la salida del láser sale del agujero 23 puntual. Sólo se usará esta fracción para la medición real en el portador 11, y es por tanto la señal de fuente más directa. Obviamente esta fracción está relacionada con la salida del láser, tal como se determina mediante por ejemplo el diodo 22 monitor integrado, pero se verá afectada por cualquier cambio o inestabilidad mecánico en la trayectoria de luz (un perfil de haz de láser es aproximadamente elíptico con un perfil gaussiano, es decir bastante no uniforme). Por tanto, es ventajoso medir la cantidad de luz del haz L1 luminoso de entrada después del agujero 23 puntual y/o después de otros componentes ópticos eventuales de la fuente 21 de luz. Esto puede hacerse de varias maneras, por ejemplo:

- puede colocarse una placa 24 de vidrio paralela a 45° o puede insertarse un cubo divisor de haz (por ejemplo transmisión del 90%, reflexión del 10%) en la trayectoria de luz detrás del agujero 23 puntual para desviar una pequeña fracción del haz luminoso hacia un sensor 22' de monitorización de luz de entrada separado;

- puede usarse un espejo pequeño en el borde del agujero 23 puntual o del haz L1 luminoso de entrada para desviar una parte pequeña del haz hacia un detector.

La figura muestra un "segundo detector 31' de luz" que puede usarse alternativa o adicionalmente para detectar luz de fluorescencia emitida por partículas 1 fluorescentes que se estimularon mediante la onda evanescente del haz L1 luminoso de entrada. Dado que esta luz de fluorescencia se emite habitualmente de manera isotrópica a todos los lados, el segundo detector 31' puede disponerse en principio en cualquier lugar, por ejemplo también por encima de la superficie 12 de unión. Además, evidentemente es posible usar también el detector 31 para la toma de muestras de luz de fluorescencia, en el que estas últimas pueden discriminarse por ejemplo espectralmente de la luz L2 reflejada.

El dispositivo de sensor microelectrónico descrito aplica medios ópticos para la detección de partículas 1 magnéticas y los componentes diana para los que la detección es realmente de interés. Para eliminar o al menos minimizar la influencia del fondo (por ejemplo del fluido de muestra, tal como saliva, sangre, etc.), la técnica de detección deberá ser específica para la superficie. Esto se consigue usando el principio de reflexión interna total frustrada que se explica a continuación.

Según la ley de Snell de la refracción, los ángulos  $\theta_A$  y  $\theta_B$  con respecto a la normal de una superficie de contacto entre dos medios A y B satisface la ecuación

$$n_A \sin \theta_A = n_B \sin \theta_B$$

siendo  $n_A$ ,  $n_B$  los índices de refracción en los medios A y B, respectivamente. Un rayo de luz en un medio A con alto índice de refracción (por ejemplo vidrio con  $n_A = 2$ ) se refractará por ejemplo alejándose de la normal a un ángulo  $\theta_B$  en la superficie de contacto con un medio B con índice de refracción inferior tal como el aire ( $n_B = 1$ ) o el agua ( $n_B \approx 1,3$ ). Una parte de la luz incidente se reflejará en la superficie de contacto, con el mismo ángulo que el ángulo  $\theta_A$  de incidencia. Cuando el ángulo  $\theta_A$  de incidencia se aumenta gradualmente, el ángulo  $\theta_B$  de refracción aumentará hasta que alcanza 90°. El ángulo de incidencia correspondiente se denomina el ángulo crítico,  $\theta_c$ , y viene dado por  $\sin \theta_c = n_B/n_A$ . A ángulos de incidencia mayores, toda la luz se reflejará dentro del medio A (vidrio), de ahí el nombre "reflexión interna total". Sin embargo, muy cerca de la superficie de contacto entre el medio A (vidrio) y el medio B (aire o agua), se forma una onda evanescente en el medio B, que disminuye exponencialmente alejándose de la superficie. La amplitud de campo como función de la distancia  $z$  desde la superficie puede expresarse como:

$$\exp(-k \sqrt{n_A^2 \sin^2(\theta_A) - n_B^2} \cdot z)$$

con  $k = 2\pi/\lambda$ , siendo  $\theta_A$  el ángulo incidente del haz reflejado totalmente, y  $n_A$  y  $n_B$  los índices de refracción de los medios asociados respectivos.

Para un valor típico de la longitud  $\lambda$  de onda, por ejemplo  $\lambda = 650$  nm, y  $n_A=1,53$  y  $n_B=1,33$ , la amplitud de campo ha

disminuido a  $\exp(-1) \approx 0,37$  de su valor original después de una distancia  $z$  de aproximadamente 228 nm. Cuando esta onda evanescente interacciona con otro medio como las partículas 1 magnéticas en la configuración de la figura 1, se acoplará parte de la luz incidente en el fluido de muestra (esto se denomina “reflexión interna total frustrada”), y se reducirá la intensidad reflejada (mientras que la intensidad reflejada será del 100% para una superficie de contacto limpia y sin interacción). Dependiendo de la cantidad de alteraciones, es decir la cantidad de perlas magnéticas sobre o muy cerca (dentro de aproximadamente 200 nm) de la superficie 12 de unión (no en el resto de la cámara 2 de muestra), la intensidad reflejada disminuirá en consecuencia. La disminución de intensidad es una medida directa para la cantidad de perlas 1 magnéticas unidas, y por tanto para la concentración de moléculas diana. Cuando la distancia de interacción mencionada de la onda evanescente de aproximadamente 200 nm se compara con las dimensiones típicas de anticuerpos, moléculas diana y perlas magnéticas, queda claro que la influencia del fondo será mínima. Las longitudes de onda  $\lambda$  mayores aumentarán la distancia de interacción, pero la influencia del líquido de fondo será todavía muy pequeña.

El procedimiento descrito es independiente de los campos magnéticos aplicados. Esto permite la monitorización óptica en tiempo real de las etapas de preparación, medición y lavado. Las señales monitorizadas también pueden usarse para controlar la medición o las etapas de procedimiento individuales.

Para los materiales de una aplicación típica, el medio A del portador 11 puede ser vidrio y/o algún plástico transparente con un índice de refracción típico de 1,52. El medio B en la cámara 2 de muestra será a base de agua y tiene un índice de refracción próximo a 1,3. Esto corresponde con un ángulo  $\theta_c$  crítico de 60°. Un ángulo de incidencia de 70° es por tanto una elección práctica para permitir medios fluidos con un índice de refracción algo superior (suponiendo  $n_A = 1,52$ , se permite  $n_B$  hasta un máximo de 1,43). Valores superiores de  $n_B$  requerirán un  $n_A$  mayor y/o ángulos de incidencia mayores.

Las ventajas de la lectura óptica descrita combinada con perlas magnéticas para el accionamiento son las siguientes:

- Cartucho barato: el cartucho 11 portador puede consistir en una pieza relativamente sencilla, moldeada por inyección, de material de polímero que también puede contener canales de fluido.

- Grandes posibilidades de multiplexado para someter a prueba múltiples analitos: la superficie 12 de unión en un cartucho desechable puede barrerse ópticamente a lo largo de un área grande. Alternativamente, es posible una obtención de imágenes de gran área permitiendo una gran red de detección. Una red de este tipo (situada sobre una superficie transparente óptica) puede fabricarse por ejemplo imprimiendo por chorro de tinta diferentes moléculas de unión sobre la superficie óptica. El método también permite pruebas de alto rendimiento en placas de pocillos usando múltiples haces y múltiples detectores y múltiples imanes de accionamiento (o bien movidos mecánicamente o bien accionados electromagnéticamente).

- El accionamiento y la detección son ortogonales: el accionamiento magnético de las partículas magnéticas (mediante grandes campos magnéticos y gradientes de campo magnético) no influye sobre el procedimiento de detección. El método óptico permite por tanto una monitorización continua de la señal durante el accionamiento. Esto proporciona mucho conocimiento sobre el procedimiento de ensayo y permite métodos de detección cinética fáciles basados en pendientes de señal.

- El sistema es realmente sensible a la superficie debido al campo evanescente que disminuye exponencialmente.

- Interfaz fácil: no se necesita interconexión eléctrica entre el cartucho y el lector. Una ventana óptica es el único requisito para analizar con sonda el cartucho. Por tanto puede realizarse una lectura sin contacto.

- Es posible una lectura con poco ruido.

La figura 2 ilustra con más detalle los ángulos de incidencia del haz L1 luminoso de entrada y el haz L2 luminoso de salida en la ventana 14 de entrada, la superficie 12 de unión y la ventana 15 de salida de un portador 11. Cuando las ventanas 14, 15 de entrada y de salida son ortogonales al haz incidente, normalmente una parte de la luz (normalmente de alrededor del 4%) se refleja de vuelta, provocando por ejemplo en la fuente 21 de luz fluctuaciones de salida no deseables de un láser (denominadas “retroalimentación de láser”). Esto distorsiona la medición.

Además, también pueden producirse efectos de interferencia en el detector de luz en el lado de detección, ya que normalmente también se usa una orientación perpendicular en este caso, y se usa una fuente de luz coherente (láser).

Debido al calentamiento no deseado del cartucho de medición, que se produce por ejemplo debido al calentamiento de los imanes 41 de accionamiento durante el funcionamiento o debido a otros factores externos, un ligero desplazamiento de las posiciones de las caras del portador puede conducir a lentas variaciones de la intensidad, tanto sobre la ramificación de la fuente de luz como la de la detección de la instalación, que son difíciles de eliminar de la medición. Colocando el detector de luz a un ángulo (en vez de perpendicular) con respecto al haz L2 luminoso

de salida incidente, ya pueden eliminarse eficazmente algunos de los problemas que se producen en el lado de detección de la instalación. Sin embargo, en el lado de la fuente de luz no es posible.

5 Por tanto es deseable realizar las ventanas 14, 15 de entrada y de salida del portador 11 de tal manera que se eliminen las reflexiones sin el uso de recubrimientos anti-reflexión ópticos caros.

10 Para solucionar este problema, se propone colocar las ventanas 14, 15 de entrada y de salida a un ángulo de Brewster con respecto al haz luminoso incidente, y proporcionar a este haz una polarización lineal en el plano de incidencia (denominada "polarización p"). Tal como se sabe por la óptica (véase por ejemplo Pedrotti & Pedrotti, Introduction to Optics, Prentice Hall), un haz reflejado se desvanece si el haz incidente con polarización p incide sobre la superficie de un medio (transparente) a un ángulo de Brewster.

15 Puede lograrse un haz L1 luminoso de entrada con polarización p eligiendo la orientación correcta de un láser semiconductor en la fuente de luz, o usando una placa de semionda para girar la polarización a la orientación correcta.

20 La propagación del haz L1 luminoso de entrada dentro del portador 11 se fija debido al hecho de que debe incidir sobre la superficie 12 de unión con un ángulo  $\theta_3$  mayor que el ángulo  $\theta_c$  crítico de TIR. Esto también fija la orientación de las caras o ventanas de entrada y de salida del portador 11, si su ángulo  $\theta_2$  o  $\theta_6$ , respectivamente, con el haz refractado debe corresponder con el ángulo de Brewster. Esto a su vez fija la dirección del haz L1 luminoso de entrada y el haz L2 luminoso de salida.

25 El ángulo  $\theta_1$  de incidencia del haz L1 luminoso de entrada es igual al ángulo de Brewster cuando la suma de este ángulo y el ángulo  $\theta_2$  de refracción es  $90^\circ$ . Esta condición en combinación con la ley de Snell conduce a la siguiente fórmula para el ángulo de incidencia a un ángulo de Brewster:

$$\tan(\theta_1) = n_2/n_1,$$

30 donde  $n_1$  es el índice de refracción del medio en el que se propaga el haz L1 luminoso de entrada antes de la refracción, normalmente el aire, y  $n_2$  del medio en el que se propaga el rayo refractado, normalmente el plástico del portador (por ejemplo policarbonato, Zeonex o poliestireno).

Para el ángulo  $\theta_2$  del haz refractado, se encuentra

35 
$$\tan(\theta_2) = n_1/n_2,$$

Otra condición que se necesita satisfacer es que el haz L1 luminoso de entrada debe incidir a un ángulo  $\theta_3$  próximo pero superior al ángulo  $\theta_c$  crítico de reflexión interna total en la superficie 12 de unión, es decir

40 
$$\theta_3 > \theta_c \text{ con } \sin(\theta_c) = n_3/n_2,$$

donde  $n_3$  es el índice de refracción del medio por encima de la superficie 12 de unión. Además, los ángulos en el lado del haz L2 luminoso de salida se reflejan con respecto al lado de entrada, es decir

45 
$$\theta_4 = \theta_3, \theta_5 = \theta_2 \text{ y } \theta_6 = \theta_1.$$

Para valores típicos de  $n_1 = 1$  (aire),  $n_2 = 1,5$  (plástico transparente) y  $n_3 = 1,3$  (de tipo agua), pueden derivarse las siguientes cifras:  $\theta_3 = \theta_4 > 60^\circ$ ,  $\theta_1 = \theta_6 = 56^\circ$ ,  $\theta_2 = \theta_5 = 34^\circ$ .

50 Colocando las ventanas de entrada y de salida del portador a un ángulo de Brewster, se evitan las reflexiones no deseadas de vuelta hacia el láser sin necesidad de un recubrimiento anti-reflexión caro. Además, colocando el detector a un ángulo, en vez de perpendicular, también pueden evitarse efectos de interferencia en el lado del detector. Haciendo esto, la expansión o contracción del portador/cartucho durante una medición, por ejemplo debido a efectos térmicos, no influirán sobre el resultado de la medición.

55 En el entorno de un laboratorio, normalmente se usan placas de pocillos que comprenden una red de muchas cámaras de muestras ("pocillos") en las que pueden tener lugar diferentes pruebas en paralelo. Las figuras 3-7 muestran diferentes realizaciones posibles de un pocillo de una placa de pocillos de este tipo que son particularmente adecuadas para una aplicación del principio de medición explicado. La producción de estos pocillos (desechables) es muy sencilla y barata ya que una etapa individual de moldeo por inyección es suficiente.

60 La fuente 121 de luz mostrada en la figura 3 se dispone para producir un haz L1 luminoso paralelo, incidente en la superficie de fondo del pocillo a un ángulo mayor que el ángulo  $\theta_c$  crítico. Para evitar un exceso de reflexión de este haz L1 luminoso de entrada en la primera superficie de contacto desde el aire hacia el portador 111 (por ejemplo vidrio o material de plástico), la parte inferior del pocillo comprende una forma 114 hemisférica de radio R,

coincidiendo su centro con la superficie 112 de detección. El haz L1 luminoso de entrada se dirige hacia este mismo centro. En el lado de reflexión, se coloca un fotodetector tal como un fotodiodo 131 para detectar la intensidad del haz L2 luminoso de salida. Un diámetro D típico del pocillo 102 oscila entre 1 y 8 mm. La figura indica además un imán 141 para generar campos de accionamiento magnéticos dentro del pocillo 102 (este imán no se muestra en las figuras siguientes por motivos de simplicidad).

La figura 4 muestra una realización alternativa en la que la fuente de luz comprende algún elemento óptico tal como una lente 222 para producir un haz L1 luminoso de entrada que se enfoca sustancialmente en el centro del hemisferio 214. En el lado de detección, puede usarse un elemento 232 óptico similar para recoger y detectar la intensidad de luz del haz L2 luminoso de salida.

En un desarrollo adicional del procedimiento de medición, pueden usarse haces luminosos de entrada y haces luminosos de salida para detectar simultáneamente la presencia de diferentes moléculas diana en diferentes ubicaciones en el mismo pocillo. La figura 5 muestra con respecto a esto un pocillo con múltiples hemisferios 314a, 314b en el fondo del pocillo que pueden usarse para acoplar la luz de múltiples haces L1a, L1b luminosos de entrada con respectivas zonas 313a, 313b de investigación en la parte inferior del pocillo. Pueden usarse múltiples fotodetectores (no mostrados) en este caso para medir los múltiples haces L2a, L2b luminosos de salida.

La figura 6 muestra una realización alternativa en la que se usa una estructura 414 de pirámide truncada o de prisma para acoplar la luz del haz L1 luminoso de entrada y el haz L2 luminoso de salida. Los bordes inclinados de la pirámide deben ser sustancialmente perpendiculares a esos rayos de luz. Las ventajas de este diseño son que es fácil de producir y no bloquea haces de áreas circundantes. Los pocillos circundantes se indican en esta figura mediante líneas discontinuas.

Tal como se indica en la figura 6, es posible usar un único haz L1 luminoso de entrada paralelo con un diámetro que cubre todas las áreas de detección en el fondo del pocillo. Como detector, pueden usarse múltiples fotodiodos, alineados con cada área de detección individual. Alternativamente, puede usarse un chip CCD o CMOS (no mostrado) tal como se usa en una cámara digital para obtener imágenes de la respuesta de intensidad reflejada de todo el fondo del pocillo, incluyendo todas las áreas de detección. Usando un procesamiento de señal apropiado, pueden derivarse todas las señales como con los detectores separados, pero sin necesidad de una alineación previa.

La figura 7 muestra una realización adicional en la que el fondo 511 del pocillo comprende una cavidad 515 abierta con su centro fuera de la trayectoria óptica del/de los haz/haces L1 luminoso(s) de entrada y del/de los haz/haces L2 luminoso(s) de salida. Esto permite los siguientes rasgos ventajosos:

- Puede colocarse un núcleo 542 de ferrita (en forma de T) de una bobina 541 magnética para obtener una mejora de la intensidad de campo y concentración cerca de la superficie 512 de unión, permitiendo un diseño compacto y de bajo consumo.

- Se consigue una estructura de autoalineación: si se fijan la óptica y el generador 541 de campo magnético, tiene lugar una autoalineación del pocillo con el núcleo 542 de ferrita.

Las perlas 1 magnéticas que se usan en las realizaciones descritas de la invención son normalmente esferas de poliestireno rellenas con pequeños granos magnéticos (por ejemplo de óxido de hierro). Esto provoca que las perlas sean superparamagnéticas. El índice de refracción de poliestireno corresponde adecuadamente con el índice de refracción de un material de sustrato típico de placas de pocillos. De esta manera se potencia el acoplamiento externo óptico de luz.

## Resultados experimentales A

A continuación, se describirán algunos resultados experimentales que se obtuvieron en una instalación con una placa de pocillos tal como la de la figura 3. Se usaron placas de titulación de poliestireno de 96 pocillos convencionales con un fondo plano (6 mm de diámetro, aproximadamente 1 mm de espesor de fondo). Para conseguir el fondo hemisférico, se fijaron lentes de vidrio a la parte inferior usando aceite de inmersión con índice de refracción correspondiente ( $n = 1,55$ ). Se pulieron las lentes de vidrio a partir de una forma hemisférica (6 mm de diámetro) a un espesor de 2 mm. El ensayo de modelo elegido para el conjunto de experimentos es drogas en la saliva. Las drogas son generalmente moléculas pequeñas que sólo presentan un epítipo y por ese motivo no pueden detectarse mediante un ensayo de tipo sándwich. Un ensayo competitivo o de inhibición es el método para detectar estas moléculas. Una instalación de ensayo competitivo bien conocida es acoplar las moléculas diana de interés sobre una superficie, y unir anticuerpos a una etiqueta de detección (por ejemplo enzima, fluoróforo o partícula magnética). Este sistema se usó para realizar un ensayo competitivo entre las moléculas diana de la muestra y las moléculas diana sobre la superficie, usando los anticuerpos marcados con etiqueta. La etiqueta en estos experimentos fue una partícula magnética. Tras el accionamiento, se colocó un imán permanente bajo el pocillo mediante movimiento mecánico. La distancia entre la parte inferior del pocillo y el imán fue de aproximadamente 2 mm. Se usó un imán permanente en el pocillo para el lavado magnético.

La figura 8 muestra la señal  $s$  de medición normalizada a lo largo del tiempo  $t$  para una primera prueba de sensibilidad. Para ello, se preparó la parte inferior de un pocillo para la detección de las moléculas diana. La diana que estaba investigándose era morfina. La morfina es una molécula pequeña, con tan sólo un epítipo, de modo que tiene que realizarse un ensayo competitivo para indicar la cantidad de morfina en una muestra. Se recubrió una superficie de poliestireno transparente (placa de titulación de 96 pocillos) durante 2 h con un intervalo de concentraciones de BSA-morfina de desde 1 pg/ml hasta 1 µg/ml. Entonces se insertaron nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas "MP" (Carboxyl-Adembeads de 300 nm funcionalizadas con anticuerpos monoclonales anti-morfina) disueltas en PBS + BSA 10 mg/ml + Tween-20 al 0,65% en los pocillos (dilución de MP de 1:20, la cantidad total de disolución fue de 50 µl). Se atrajeron las MP hacia la superficie mediante aplicación alternada de fuerzas magnéticas (del orden de 10 fN) tal como se indica mediante el símbolo A en la figura 8. Al final, se eliminaron partículas no unidas de la superficie mediante una etapa de lavado, indicada mediante el símbolo W en la figura 8. La figura muestra que la menor concentración de BSA-morfina (10 pg/ml) proporciona el mayor intervalo de medición dinámica. Además, la pendiente de la curva tras el accionamiento es la más grande, permitiendo una rápida respuesta/tiempo de medición corto y la mayor sensibilidad.

Para someter a prueba la sensibilidad del ensayo, se sometió a prueba la capacidad de morfina libre para competir con la unión de MP funcionalizadas a la superficie. La figura 9 muestra la señal  $s$  normalizada resultante recogida por el detector como función del tiempo  $t$ . Se recubrió una superficie de poliestireno transparente (placa de microtitulación de 96 pocillos) durante 2 h con BSA-morfina 10 pg/ml. Se insertaron MP funcionalizadas con anticuerpos anti-morfina mezclados previamente con una cantidad definida de morfina libre disuelta en PBS + BSA 10 mg/ml + Tween-20 al 0,65% en los pocillos (dilución de MP de 1:20, la cantidad total de disolución fue de 40 µl). Tal como se describió anteriormente y se indica en la figura, se accionaron las MP cuatro veces a  $t = 30$  s,  $t = 140$  s,  $t = 210$  s,  $t = 290$  s durante 15 seg. (véase el símbolo A). A  $t = 390$  s se retiraron las MP no unidas del pocillo por medio de lavado magnético W, es decir se eliminan las MP no unidas aplicando una fuerza magnética usando un imán permanente en el fluido por encima de la superficie de unión.

Puede observarse a partir de la figura que para las mayores concentraciones de morfina libre, la reducción de señal (tras el lavado magnético W) es baja, mientras que para una baja concentración de morfina libre la reducción de señal es alta (conduciendo una alta concentración de MP sobre la superficie a una clara reducción de la señal tras el lavado magnético W).

La reducción de señal durante el accionamiento y la relajación magnética tal como se encuentra en estos experimentos, junto con información ya recopilada de investigaciones microscópicas, propone la siguiente interpretación de los resultados: tras el accionamiento magnético, las MP se concentran en la superficie, sin mostrar un aumento en la unión a la superficie (ninguna disminución de señal). Tras retirarlas del campo magnético, la señal disminuye indicando unión de las MP a la superficie. La aplicación de un campo magnético induce entonces formación de pilares: las MP se magnetizan y las que pueden moverse libremente (MP unidas de manera no específica y MP libres en disolución) se unirán a las MP unidas específicamente en la dirección de las líneas del campo magnético, que son perpendiculares a la superficie de unión. Este estado se ilustra en la figura 10, que también indica el campo evanescente EF. Dado que el sistema de detección de evanescencia sólo detectará MP en la superficie, la formación de pilares durante el accionamiento magnético dará como resultado una reducción del cambio de señal. Tras retirarse del campo magnético, las MP perderán su propiedad magnética, y caerán de nuevo a la superficie en la que puede tener lugar la unión.

Para obtener un ensayo rápido, el esquema de accionamiento puede optimizarse usando los resultados anteriores. La figura 11 muestra una curva de respuesta a la dosis con pocillos de poliestireno recubiertos con BSA-morfina 10 pg/ml. Se insertaron MP funcionalizadas con anticuerpos anti-morfina previamente mezclados con una cantidad definida de morfina libre disuelta en PBS + BSA 10 mg/ml + Tween-20 al 0,65% en los pocillos (dilución de MP de 1:20, la cantidad total de disolución fue de 40 µl, concentraciones de morfina finales de entre 1 y 1000 ng/ml). Se accionaron las MP en A usando un imán permanente por debajo del pocillo durante 15 segundos, para aumentar la concentración de las MP cerca de la superficie. A continuación, se dejó que las MP se unieran a la superficie durante 60 segundos. Los datos muestran que ya tras 20 segundos la tasa de unión de partículas magnéticas a la superficie es una medida directa de la concentración de morfina libre en disolución. Esto significa que el procedimiento de medición puede simplificarse y ser más rápido, ya que no se necesita ninguna etapa de lavado. Para que esto se produzca rápidamente, se necesita la etapa A de aumento de la concentración magnética.

A continuación, se sometió a prueba la señal de fondo de la saliva. Se introdujo saliva filtrada en un pocillo y se realizó un seguimiento de la señal durante 120 segundos. El fondo es despreciable tal como puede observarse en la figura 12. Como comparación, también se incluye la señal de MP en PBS + BSA 10 mg/ml + Tween-20 al 0,65% mezclado con morfina 0,1 ng/ml. En  $t = 13$  s, se inyectaron tanto la saliva (SL) como la disolución de morfina + MP. Puede observarse que la señal de fondo de la saliva es  $< 1\%$  y puede despreciarse.

#### Resultados experimentales B

Para verificar la sensibilidad del método de detección se llevó a cabo un ensayo de PTH (PTH = hormona paratiroidea) de dos etapas en las placas de pocillos descritas con un sustrato óptico. En la figura 13 se representan

los transitorios de señal  $s$  (unidades arbitrarias) como función del tiempo  $t$  tanto para un blanco (0 nM, curva superior) como para una concentración relativamente alta (4 nM). Se observa una clara diferencia en el régimen de unión cinética y también permanece una clara diferencia de señal tras el lavado  $W$ .

5 Con el fin de comparar la lectura magnética (mediante sensores de magnetorresistencia gigante (GMR) tal como se describen por ejemplo en los documentos WO 2005/010543 A1 o WO 2005/010542 A2) con la lectura óptica (mediante el principio de la reflexión interna total frustrada explicado anteriormente), se traza la curva de respuesta a la dosis de PTH en la figura 14.

10 Las curvas transitorias correspondientes para el ensayo de PTH ópticamente se facilitan en la figura 15. La curva de respuesta a la dosis en la figura 14 se mide en una matriz de tampón. La curva muestra la señal  $s$  óptica como porcentaje de la señal provocada por la reflexión a partir de un sustrato vacío. Resulta interesante indicar que la curva es lineal en una escala log-log (de manera similar a la curva detectada magnéticamente). Además, pueden calcularse límites de detección según "blanco+2\*desviación estándar del patrón" (donde "blanco" indica el nivel de señal cuando se somete a prueba una muestra con una concentración diana nula).

Para la lectura magnética este valor es igual a 3 pM. Para el experimento óptico, que se realizó con una configuración experimental muy básica, este valor es igual a 13 pM. Puede concluirse que ambas técnicas de detección parecen tener la misma sensibilidad.

20 A continuación es muy importante verificar la señal de fondo para el método de detección óptica cuando se mide en matrices complejas. Por este motivo, se llevó a cabo el mismo ensayo de PTH en una matriz de sangre. A partir de los resultados mostrados en la figura 16 (sang. = sangre, tam. = tampón) queda claro que la respuesta a la dosis resultante corresponde muy bien con la curva que se midió en tampón. Además, la señal de blanco es muy baja.

25 Esta buena propiedad se atribuye al hecho de que la reflexión interna total está provocada por la diferencia de índice de refracción entre el material de sustrato óptico y la matriz. La matriz puede consistir en diferentes componentes tales como plasma, células (glóbulos rojos), etc. Sin embargo, todos estos componentes tienen un índice de refracción significativamente inferior al del material de sustrato. Por tanto, la reflexión interna total no se ve influida por la matriz. Sólo cuando se unen las perlas (por ejemplo, poliestireno de alto índice con granos magnéticos) se frustra la reflexión interna total y puede medirse una disminución de la intensidad reflejada.

#### Resultados experimentales C

35 Una prueba importante para la tecnología propuesta es la denominada curva de respuesta a la perla. Proporciona una indicación del cambio de señal por perla unida a la superficie de sensor. De manera ideal, es posible la detección de una única perla (en presencia de ruido, alteraciones). En esta situación ya no se necesita una mejora adicional de la tecnología de detección. Entonces el límite de detección biológico sólo puede mejorarse mediante métodos tales como aumento de la concentración de perlas (en un ensayo de ensayo de atrapamiento), etc. La figura 17 muestra la curva de respuesta a la perla en caso de detección con un sensor de tipo GMR y perlas de 300 nm ( $\Delta s$  = cambio de señal; BD = densidad de perlas; NB = número de perlas). Para estas perlas el límite de detección fue de 3 perlas en  $40 \mu\text{m}^2$  para una frecuencia de muestre de 1 Hz.

45 Con el fin de estimar la respuesta a la perla para una detección óptica, se prepararon varias muestras (portaobjetos de vidrio) con diversas concentraciones de perlas. Se determinó la cobertura de superficie resultante usando un microscopio óptico, seguido por una medición (del cambio) de la señal  $s$  óptica en comparación con una muestra de referencia limpia sin perlas. Los datos experimentales tal como se obtuvieron con una configuración sencilla se representan en la figura 18. En esta configuración, el nivel de ruido corresponde a un cambio de señal a una cobertura de superficie SC del 0,01%. Estos datos muestran que la sensibilidad de esta técnica es al menos similar a los resultados del estado de la técnica usando sensores de GMR a las mismas concentraciones de perlas.

50 En resumen, la invención se refiere a un dispositivo de sensor microelectrónico para la detección de componentes diana que comprenden partículas de marcador, por ejemplo partículas 1 magnéticas. El dispositivo de sensor comprende un portador 11 con una superficie 12 de unión en la que pueden recogerse componentes diana y unirse ópticamente a elementos de captura específicos. Se transmite un haz L1 luminoso de entrada al interior del portador y se refleja internamente de manera total en la superficie 12 de unión. Entonces se detecta la cantidad de luz en el haz L2 luminoso de salida mediante un detector 31 de luz. La luz evanescente generada durante la reflexión interna total interacciona con las partículas 1 de marcador unidas a partículas diana en la superficie 12 de unión conduciendo a la absorción y/o dispersión y por tanto faltará del haz L2 luminoso de salida. Esto puede usarse para determinar la cantidad de componentes diana en la superficie 12 de unión a partir de la cantidad de luz en el haz L2, L2a, L2b luminoso de salida. Opcionalmente se usa un generador 41 de campo magnético para generar un campo B magnético en la superficie 12 de unión mediante lo cual pueden manipularse las partículas 1 de marcador magnéticas, por ejemplo atraerse o repelerse.

65 Las partículas 1 de marcador son por ejemplo perlas magnéticas, lo que significa partículas magnéticas MP, en un ejemplo partículas o perlas paramagnéticas, ferromagnéticas o superparamagnéticas. Estas partículas 1 de marcador están sujetas a la reflexión del haz L1 luminoso que incide sobre la superficie 12 de unión del portador.

Cuanto más partículas 1 de marcador están unidas a la superficie 12 de unión menos reflexión interna total experimentará el haz L1 luminoso en la superficie 12 de unión sino que se generará una onda evanescente. El haz L2 luminoso reflejado por la superficie 12 de unión se denomina frustrado por el efecto de dispersión del haz L1 luminoso incidente por las partículas 1 de marcador. Cuanto más partículas 1 de marcador están unidas a la superficie de unión más se frustra el haz L2 luminoso reflejado. El detector 31, 131 de luz mide el haz L2 luminoso procedente de la superficie 12 de unión y usa el haz L2 luminoso reflejado para medir la cantidad de partículas 1 de marcador unidas en la superficie 12 de unión. Cuanto más partículas 1 de marcador están unidas a la superficie 12 de unión más dispersión del haz L1 luminoso debido a las partículas 1 de marcador tiene lugar con la generación de la onda evanescente. Las partículas 1 de marcador que permiten el efecto descrito tienen por ejemplo las siguientes características. Perlas magnéticas con un ancho de aproximadamente 300 nm de partículas superparamagnéticas uniformes que contienen una estructura de corteza y núcleo polimérica. Estas partículas 1 de marcador o perlas magnéticas muestran una dispersión del haz L1 luminoso que es suficiente para la detección del haz L2 luminoso reflejado para determinar las partículas 1 de marcador. También son viables partículas 1 de marcador de materiales y anchos similares, por ejemplo partículas 1 de marcador con un ancho de 200 nm. No obstante, se encuentra que la dispersión de la luz a partir sólo de los componentes diana a los que se unen las partículas 1 de marcador no es adecuada para la detección. Esto significa que no es posible la medición directa de componentes diana mediante reflexión interna frustrada para medir la cantidad de estos componentes diana. La detección y el posterior cálculo de la cantidad de partículas 1 diana se hace posible mediante la dispersión de luz en las partículas 1 de marcador. En el presente documento, no se necesita ninguna detección de fluorescencia de material fluorescente, tal como se usa en el estado de la técnica con otros sistemas de detección óptica. Además en este contexto debe destacarse que la detección de luz de fluorescencia emitida por los componentes diana es una característica adicional que puede combinarse con el método y dispositivo de sensor descritos.

Aunque se ha descrito la invención anteriormente con referencia a realizaciones particulares, diversas modificaciones y extensiones son posibles, por ejemplo:

- Además de ensayos moleculares, también pueden detectarse restos más grandes con dispositivos de sensor según la invención, por ejemplo células, virus o fracciones de células o virus, extracto tisular, etc.

- La detección puede producirse con o sin barrido del elemento de sensor con respecto a la superficie de sensor.

- Pueden derivarse datos de medición como medición de punto final, así como registrando señales de manera cinética o intermitente.

- Las partículas que sirven como marcadores pueden detectarse directamente mediante el método de detección. Asimismo, las partículas pueden procesarse adicionalmente antes de la detección. Un ejemplo de procesamiento adicional es que se añaden materiales o que se modifican las propiedades (bio)químicas o físicas del marcador para facilitar la detección.

- El dispositivo y el método pueden usarse con diversos tipos de ensayos bioquímicos, por ejemplo ensayo de unión/separación, ensayo tipo sándwich, ensayo de competición, ensayo de separación, ensayo enzimático, etc. Es especialmente adecuado para la detección de ADN debido a que es fácilmente posible un multiplexado a gran escala y pueden detectarse diferentes oligómeros por medio de impresión por chorro de tinta sobre el sustrato óptico.

- El dispositivo y el método son adecuados para el multiplexado de sensores (es decir el uso paralelo de diferentes sensores y superficies de sensor), multiplexado de marcadores (es decir el uso paralelo de diferentes tipos de marcadores) y el multiplexado de cámaras (es decir el uso paralelo de diferentes cámaras de reacción).

- El dispositivo y el método pueden usarse como biosensores de punto de atención rápidos, robustos y fáciles de usar para volúmenes de muestra pequeños. La cámara de reacción puede ser un elemento desechable para usarse con un lector compacto, que contiene el uno o más medios generadores de campo y uno o más medios de detección. Además, el dispositivo, los métodos y los sistemas de la presente invención pueden usarse en pruebas de alto rendimiento automatizadas. En este caso, la cámara de reacción es por ejemplo una placa de pocillos o cubeta, que se equipa en un instrumento automatizado.

Finalmente se indica que en la presente solicitud el término "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, que "un" o "una" no excluyen una pluralidad, y que un procesador individual u otra unidad puede cumplir las funciones de diversos medios. La invención se encuentra en todos y cada uno de los rasgos característicos novedosos y todas y cada una de las combinaciones de rasgos característicos. Además, los signos de referencia en las reivindicaciones no deben interpretarse como limitativos de su alcance.

# REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de sensor microelectrónico para la detección de componentes diana que comprenden partículas (1) de marcador, que comprende  
5  
a) un portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) que comprende una cámara (2, 102) de muestra con una pared de inspección transparente que tiene en su lado interior una superficie (12, 112, 512) de unión en la que pueden recogerse componentes diana; y, en su lado exterior al menos una estructura (114, 214, 314a, 314b, 414) óptica  
10  
b) una fuente (21, 121) de luz para emitir un haz (L1, L1a, L1b) luminoso de entrada al interior del portador de tal manera que se refleja internamente de manera total en una zona (13, 313a, 313b) de investigación en la superficie de unión, frustrándose el haz luminoso reflejado internamente de manera total dando como resultado una disminución de la intensidad de luz reflejada internamente de manera total cuando las partículas (1) de marcador que están unidas a los componentes diana son partículas de dispersión y/o absorción macroscópicas;  
15  
c) un detector (31, 131) de luz para determinar la cantidad de luz en un haz (L2, L2a, L2b) luminoso de salida que comprende al menos algo de la luz reflejada internamente de manera total frustrada.  
20
2. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
25  
caracterizado porque comprende generadores (41, 141, 541) de campo para generar un campo (B) magnético y/o un campo eléctrico que puede afectar a las partículas (1) de marcador, y porque comprende una pluralidad de generadores (41, 141, 541) de campo controlables individualmente asociados a zonas de investigación diferentes.
3. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
30  
caracterizado porque comprende una cámara (2, 102) de muestra adyacente a la superficie (12, 112, 512) de unión en la que puede proporcionarse una muestra con componentes diana y porque comprende un módulo (32) de evaluación para determinar la cantidad de componentes diana en la zona (13, 313a, 313b) de investigación a partir del haz (L2, L2a, L2b) luminoso de salida medido.
- 35 4. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
caracterizado porque comprende un módulo (32) de registro para monitorizar la cantidad determinada de luz reflejada a lo largo de un periodo de observación.
- 40 5. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
45  
caracterizado porque el portador comprende una pluralidad de zonas (313a, 313b) de investigación en las que pueden reflejarse internamente de manera total haces (L1a, L1b) luminosos de entrada diferentes y porque comprende un módulo de barrido para acoplar ópticamente la fuente de luz y/o el detector de luz a zonas (313a, 313b) de investigación diferentes en la superficie de unión, y porque comprende una pluralidad de fuentes de luz y/o una pluralidad de detectores de luz que están ópticamente acoplados a zonas (313a, 313b) de investigación diferentes en la superficie (12) de unión.
- 50 6. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
caracterizado porque comprende partículas (1) de marcador con un manto de un material transparente, en particular un material con un índice de refracción similar al del portador (11, 111, 211, 311, 411, 511).
- 55 7. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
caracterizado porque comprende un segundo detector (31') de luz para determinar luz de fluorescencia emitida por componentes diana en la superficie de unión.
- 60 8. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
65  
caracterizado porque comprende un sensor (22, 22') de monitorización de luz de entrada para determinar la cantidad de luz en el haz (L1) luminoso de entrada, y porque el sensor (22, 22') de monitorización de luz de entrada está dispuesto dentro de la fuente (21) de luz o fuera de ella, y porque comprende un módulo (32) de evaluación para relacionar la cantidad determinada de luz en el haz (L2) luminoso de salida con la cantidad determinada de luz en el haz (L1) luminoso de entrada.



9. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
caracterizado porque la fuente (21) de luz está adaptada para generar un haz (L1) luminoso de entrada polarizado, particularmente un haz (L1) luminoso de entrada polarizado linealmente, y porque el haz (L1) luminoso de entrada tiene una polarización (p) lineal en el plano de incidencia con respecto a una ventana (14) de entrada en la que entra en el portador (11) y/o  
porque el haz (L2) luminoso de salida tiene una polarización lineal en el plano de incidencia con respecto a una ventana (15) de salida en la que abandona el portador (11).
10. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1,  
caracterizado porque la ventana (14) de entrada en la que el haz (L1) luminoso de entrada entra en el portador (11) está a un ángulo ( $\theta_1$ ) de Brewster con respecto al haz (L1) luminoso de entrada y/o  
porque la ventana (15) de salida en la que el haz (L2) luminoso de salida abandona el portador (11) está a un ángulo ( $\theta_2$ ) de Brewster con respecto al haz (L2) luminoso de salida.
11. Portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) para proporcionar una muestra que va a investigarse, para un dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1, que comprende una cámara (2, 102) de muestra con una pared de inspección transparente que tiene en su lado interior una superficie (12, 112, 512) de unión y en su lado exterior al menos una estructura (114, 214, 314a, 314b, 414) óptica, en el que la estructura óptica está diseñada de tal manera que un haz (L1, L1a, L1b) luminoso de entrada dirigido desde fuera del portador sobre la estructura óptica entra en la pared de inspección y se refleja internamente de manera total en una zona (13, 313a, 313b) de investigación en la superficie de unión, frustrándose el haz luminoso reflejado internamente de manera total dando como resultado una disminución de la intensidad de luz reflejada internamente de manera total cuando las partículas (1) de marcador que están unidas a los componentes diana son partículas de dispersión y/o absorción macroscópicas, y porque un haz (L2, L2a, L2b) luminoso de salida y/o luz de fluorescencia emitido por los componentes diana en la superficie de unión abandona la pared de inspección a través de la estructura óptica.
12. Placa de pocillos que comprende una pluralidad de portadores según la reivindicación 11.
13. Dispositivo de sensor microelectrónico según la reivindicación 1, portador según la reivindicación 11, o placa de pocillos según la reivindicación 12,  
caracterizado porque el portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) consiste en un material transparente, porque la zona (13, 313a, 313b) de investigación tiene una rugosidad baja, preferiblemente una rugosidad de  $0,5 \lambda$ , lo más preferiblemente de  $0,1 \lambda$ , o menos, siendo  $\lambda$  una longitud de onda característica del haz (L1) luminoso de entrada, porque la zona (13, 313a, 313b) de investigación está cubierta con al menos un elemento de captura que puede unirse a componentes diana, porque la superficie del portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) es sustancialmente perpendicular al haz (L1, L1a, L1b) luminoso de entrada y/o al haz (L2, L2a, L2b) luminoso de salida en la ventana (14) de entrada o la ventana (15) de salida en las que este haz entra en o abandona el portador, respectivamente, porque el portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) comprende al menos una parte de superficie con una forma como un hemisferio (114, 214, 314a, 314b) o una pirámide (414) truncada, porque el portador (511) comprende una cavidad (515) en la que puede disponerse al menos parcialmente un generador (541) de campo, y porque el portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) está diseñado como un componente intercambiable.
14. Método para la detección de componentes diana que comprenden partículas (1) de marcador, que comprende  
a) recoger los componentes diana en una superficie (12, 112, 512) de unión de un portador (11, 111, 211, 311, 411, 511) que comprende una cámara (2, 102) de muestra con una pared de inspección transparente que tiene en su lado interior  
b) dirigir un haz (L1, L1a, L1b) luminoso de entrada al interior del portador de tal manera que se refleja internamente de manera total en una zona (13, 313a, 313b) de investigación en la superficie (12, 112, 512) de unión, frustrándose el haz luminoso reflejado internamente de manera total dando como resultado una disminución de la intensidad de luz reflejada internamente de manera total cuando las partículas (1) de marcador que están unidas a los compuestos diana son partículas de dispersión y/o absorción macroscópicas  
c) determinar la cantidad de luz de un haz (L2, L2a, L2b) luminoso de salida que comprende al menos algo de la luz reflejada internamente de manera total, y

caracterizado porque las partículas (1) de marcador se manipulan mediante un campo (B) magnético o eléctrico, particularmente se atraen o se repelen de la zona (13, 313a, 313b) de investigación, y porque se mide la cantidad de luz en el haz (L1) luminoso de entrada y se relaciona con la cantidad medida de luz en el haz (L2) luminoso de salida.

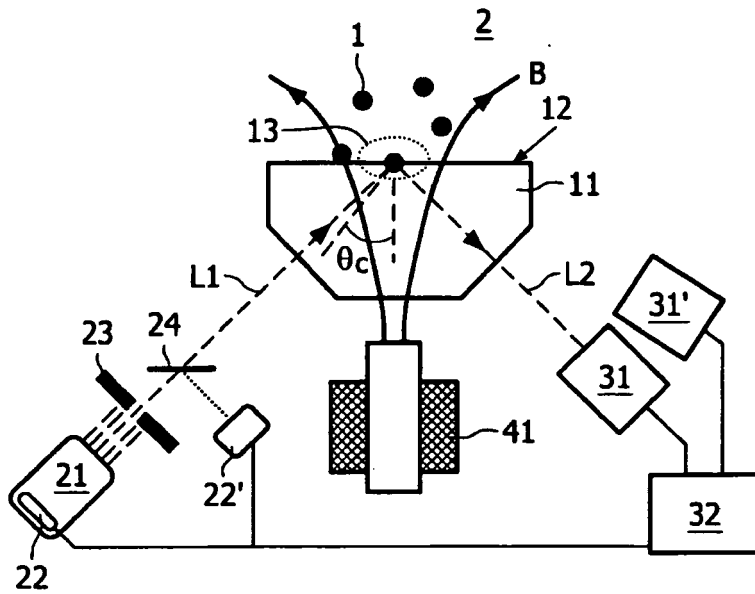


FIG. 1

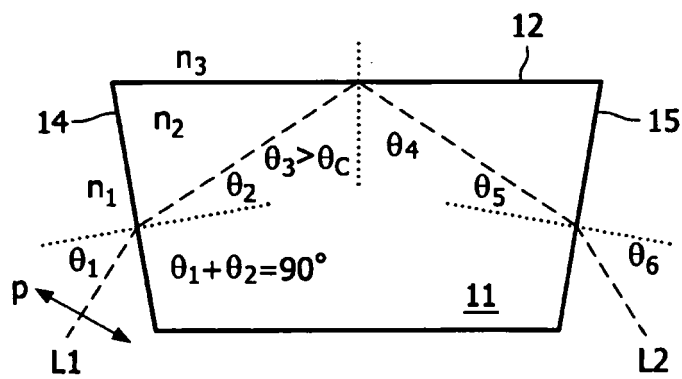


FIG. 2

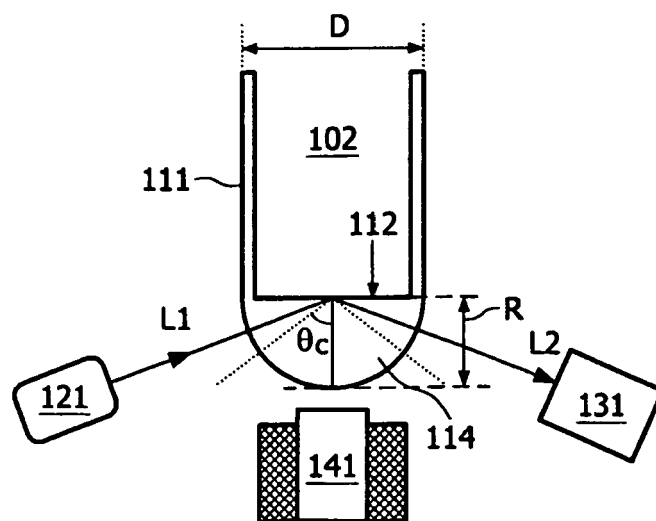


FIG. 3

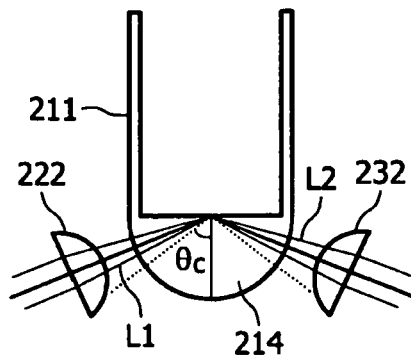


FIG. 4

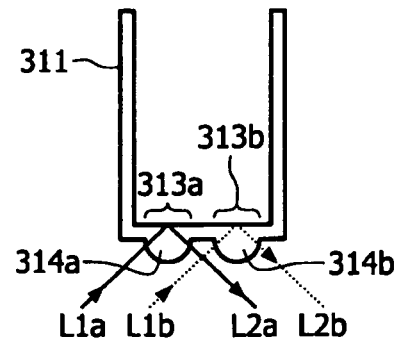


FIG. 5

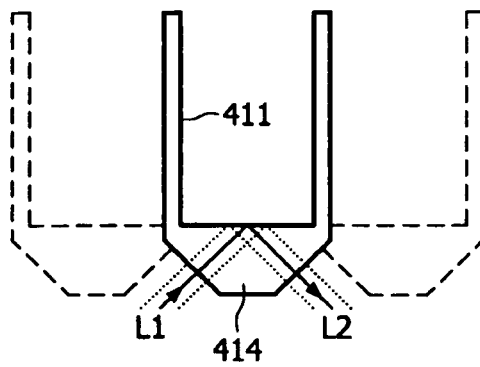


FIG. 6

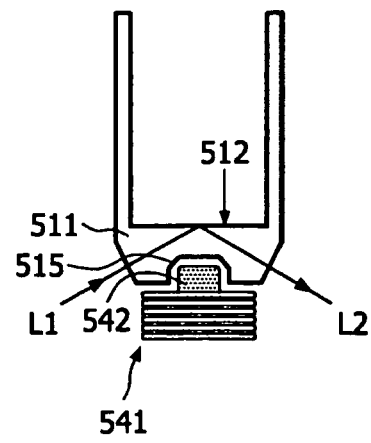


FIG. 7

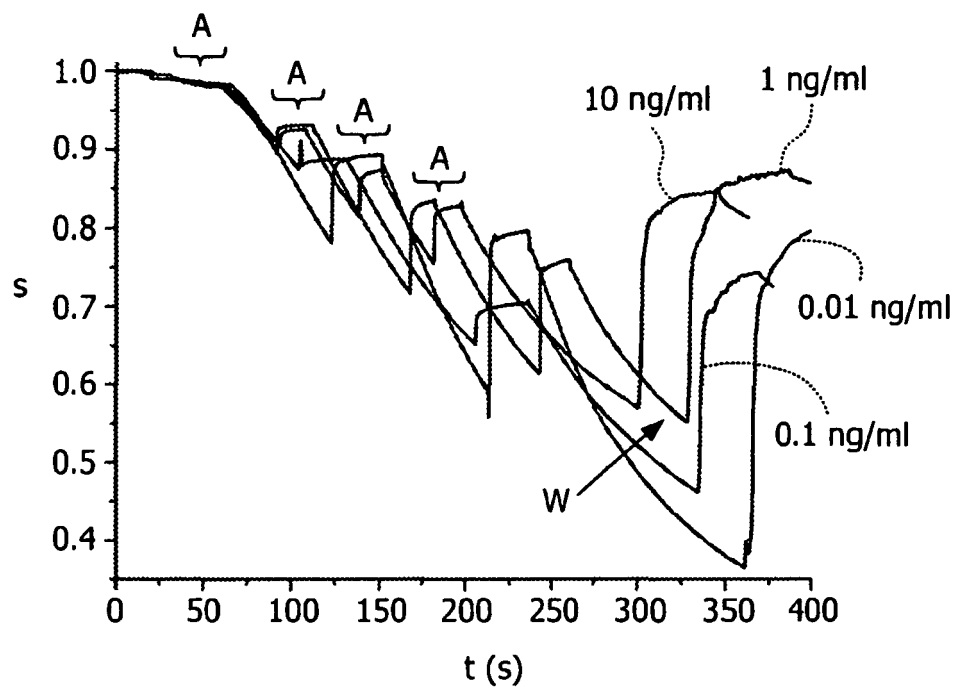


FIG. 8

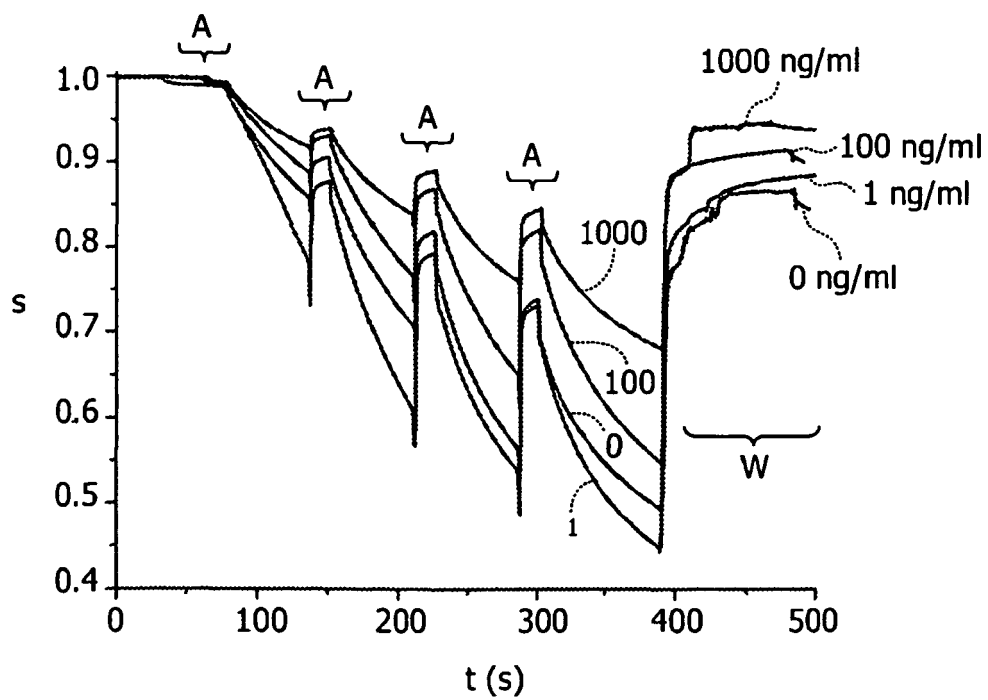


FIG. 9

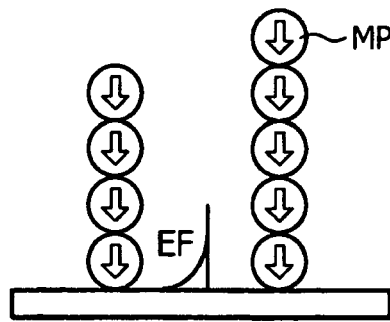


FIG. 10

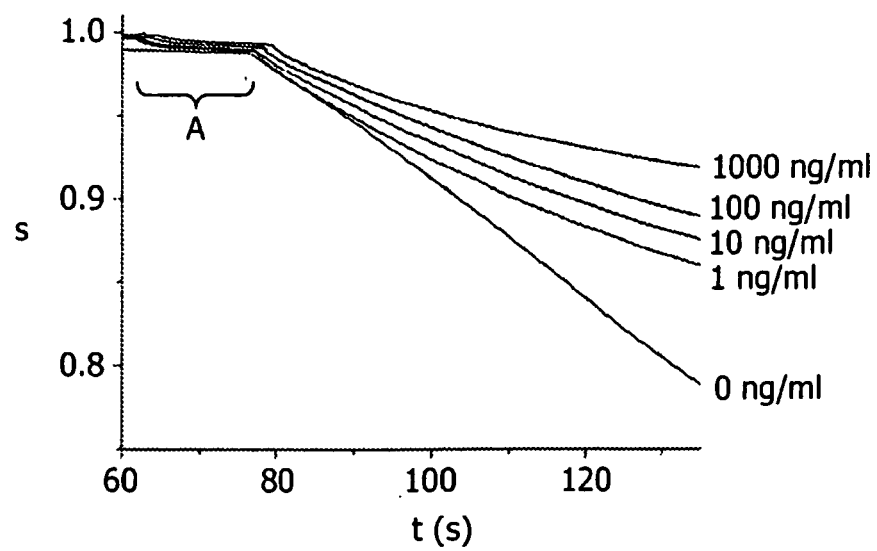


FIG. 11

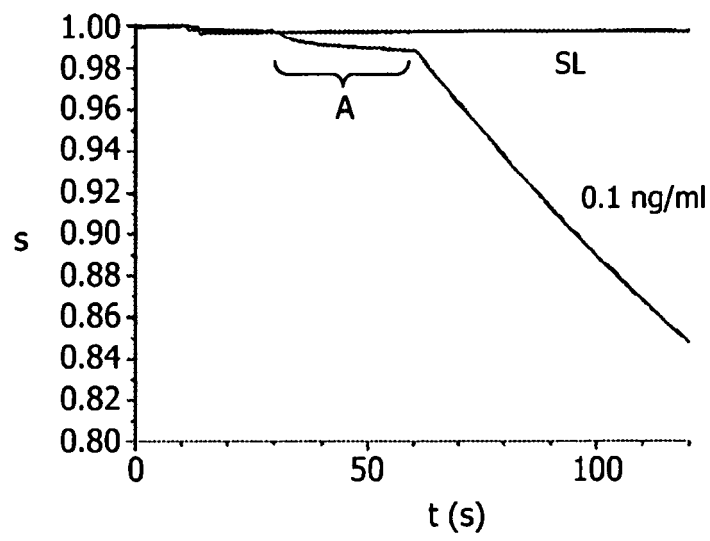


FIG. 12

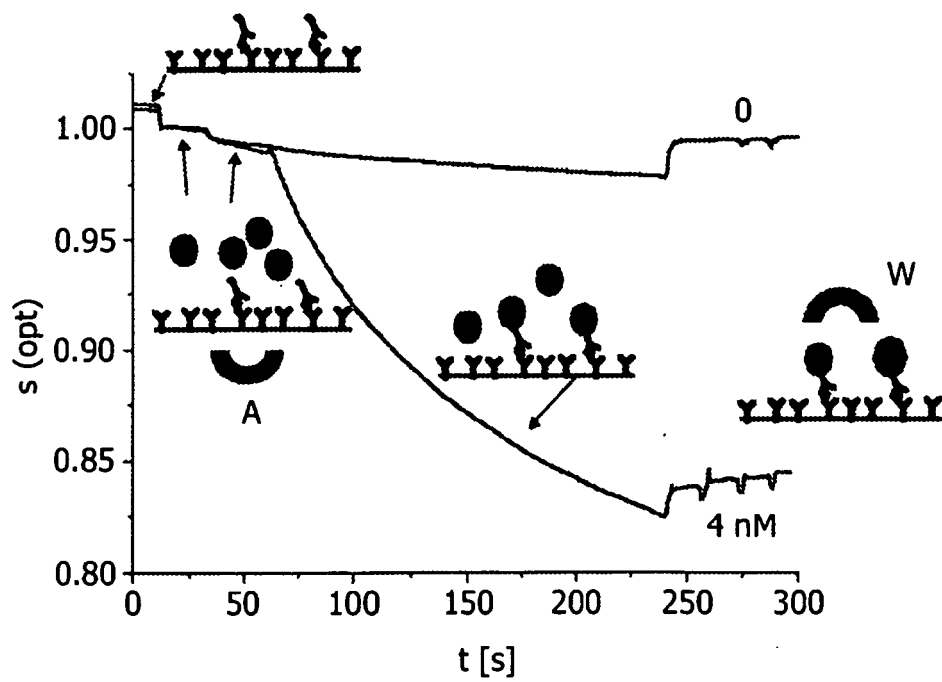


FIG. 13

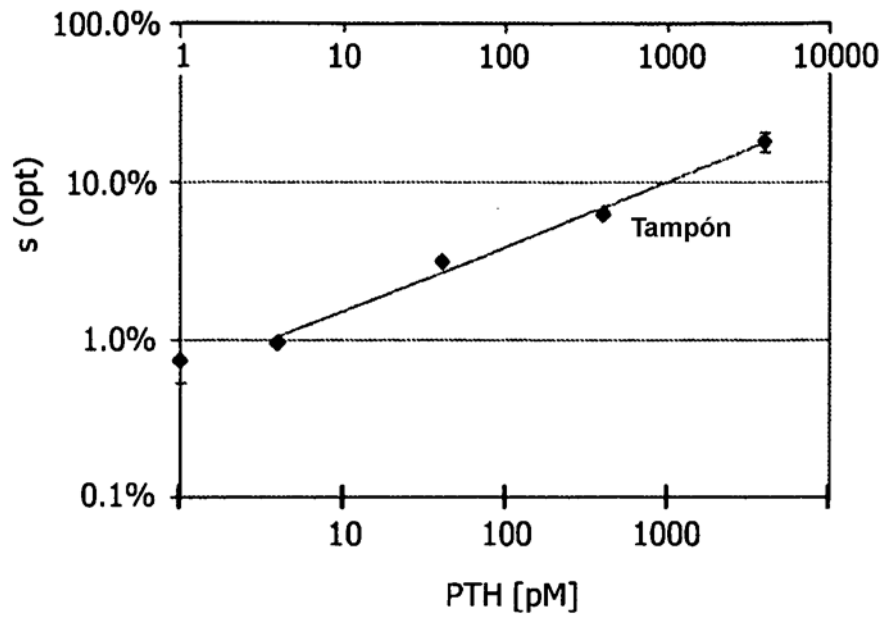


FIG. 14

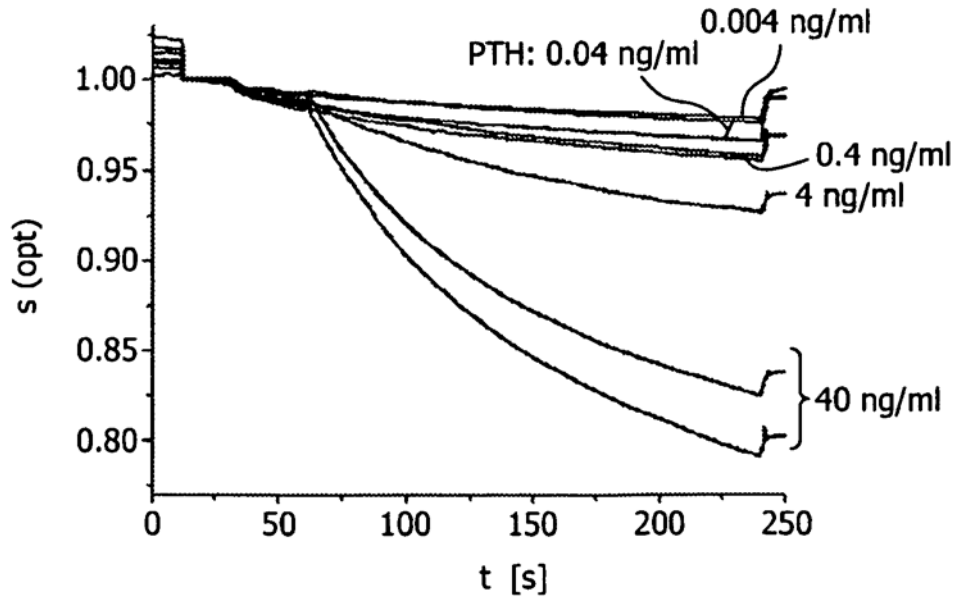


FIG. 15



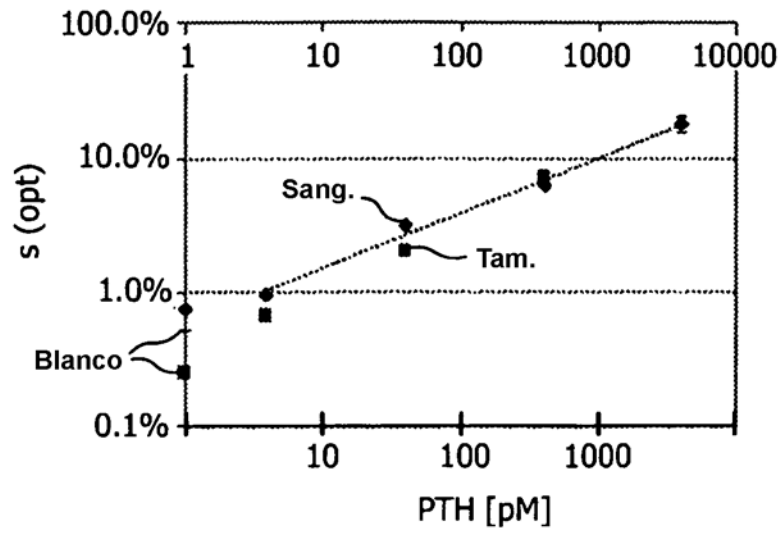


FIG. 16

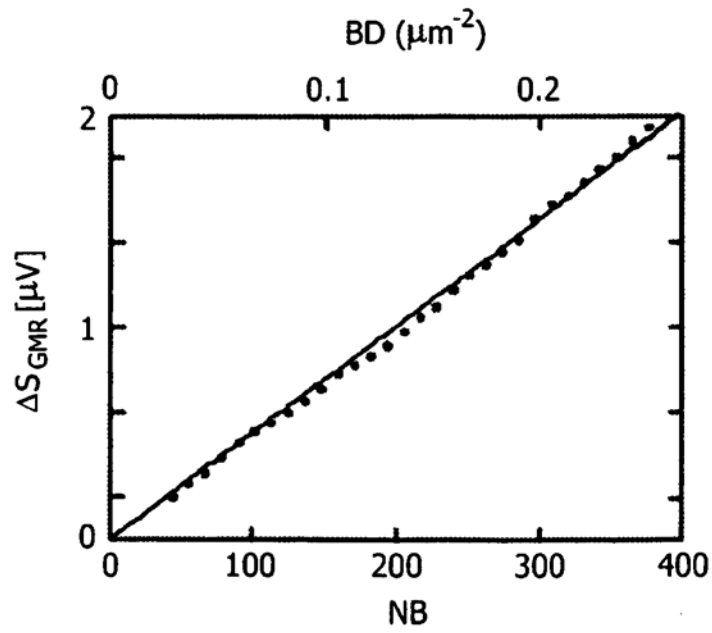


FIG. 17

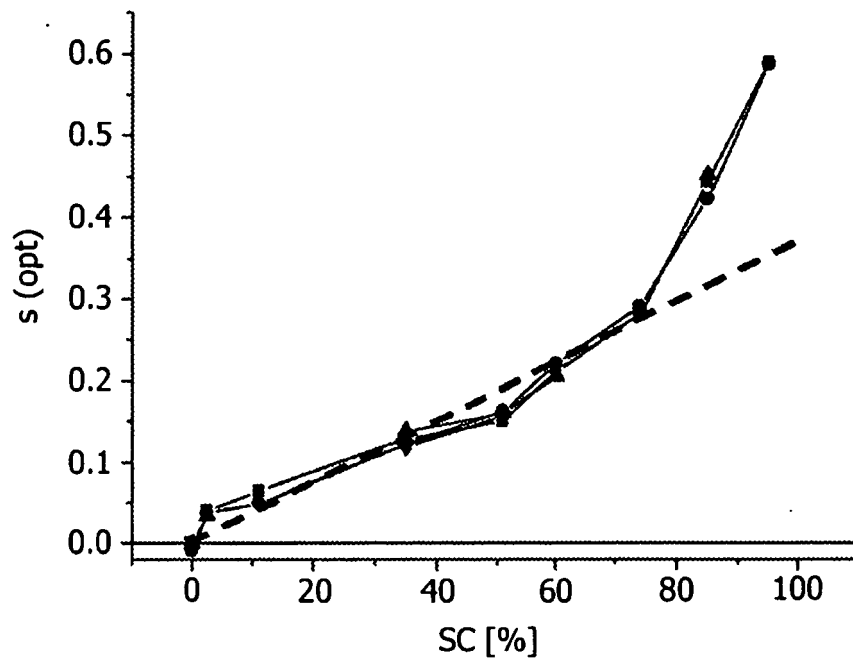


FIG. 18