



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 923 051**

⑮ Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)
G01N 29/24 (2006.01)
G01N 23/225 (2008.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/US2016/036834**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16201189**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16808348 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2022 EP 3308145**

⑭ Título: **Procedimiento para la detección de agentes químicos y biológicos mediante resonancia plasmónica de superficie**

⑩ Prioridad:

12.06.2015 US 201562175034 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2022

⑬ Titular/es:

LACRISCIENCES, LLC (100.0%)
4910 Massachusetts Avenue, N.W. Suite 21
Washington DC 20016, US

⑭ Inventor/es:

SARKAR, DIPTABHAS;
GAVARIS, PAUL T.;
GEDDES, CHRIS D.;
GHOVANLOU, ALI H. y
CAPPO, ANTHONY, P.

⑭ Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 923 051 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de agentes químicos y biológicos mediante resonancia plasmónica de superficie

5 **CAMPO TÉCNICO**

10 [0001] Se dan a conocer sistemas, procedimientos y dispositivos/aparatos que utilizan resonancia plasmónica de superficie para la medición de concentraciones muy pequeñas de soluto. De manera particular, se da a conocer un sistema y particularmente aparatos que toman la forma de un instrumento analítico portátil capaz de realizar de manera conveniente mediciones precisas fuera de un entorno de laboratorio y, de manera particular, entornos hostiles.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 [0002] Los sistemas de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) son bien conocidos y se utilizan de manera general en un entorno de laboratorio como sistemas analíticos de mesa. El fenómeno de fluctuaciones de plasmones superficiales generadas en una capa delgada de película de metal tiene lugar cuando la luz incidente golpea la superficie en un ángulo particular. Un sistema de detección simple puede detectar cambios en la fluctuación o frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales, que cambia en función del entorno que rodea la superficie metálica. Esto lleva a detección de cambios ínfimos en, por ejemplo, la concentración de una solución en contacto con la superficie de metal. El núcleo del instrumento es óptico por naturaleza empleando una fuente de luz, óptica, (lentes, prismas) y detector óptico.

20 [0003] Los sistemas habituales de SPR emplean la configuración de Kretschmann, en la que la luz se inyecta en un sustrato de vidrio, típicamente con la forma de un prisma hemicilíndrico (un cilindro cortado por la mitad a lo largo del eje con una superficie curvada pulida y una superficie plana pulida), de tal modo que el haz incidente golpea la superficie plana del prisma con un ángulo superior al ángulo crítico de la interfase que provoca una reflexión interna total (TIR). Una película delgada de metal, típicamente oro de 50 nm de grosor, se deposita sobre la superficie plana del prisma hemicilíndrico. Con un ángulo particular de incidencia (mayor que el ángulo crítico), la onda evanescente generada a partir de TIR penetra en la capa de oro y se acopla con modos de plasmones superficiales en el metal fijándolos en la fluctuación. Los Plasmones Superficiales (SP) son las oscilaciones longitudinales de electrones libres sobre la superficie de metal. La exploración de la frecuencia de estos modos de plasmones superficiales mediante la detección del ángulo de incidencia con el que se lanzan es la base de espectroscopía de resonancia plasmónica de superficie (SPR). Es importante señalar que el haz de luz golpea la película metálica en la interfase con el medio de vidrio; a esto se hace referencia como la parte inferior. Sin embargo, los SP se lanzan a la otra parte de la capa o película metálica, que es entonces la parte superior. Los SP son también efímeros por naturaleza, lo que significa que cualquier cambio a poca distancia de la parte superior, típicamente del tipo de la longitud de onda del haz incidente, afecta a la frecuencia de plasmones. Para utilizar la SPR como un sensor biológico o químico, los ligandos se adhieren a la parte superior. Cuando los analitos se unen a estos ligandos, los cambios en esta capa de metal (por ejemplo, oro) se ven afectados de forma inmediata cerca de la parte superior, lo que lleva a cambios en la frecuencia de SPR. 40 Examinando estos cambios desde la parte inferior de la capa de oro, se pueden detectar las moléculas diana específicas. La parte superior de la capa de metal es, por lo tanto, también la superficie sensible.

45 [0004] Los sistemas de SPR se utilizan de manera rutinaria en biología, química y ciencia de materiales, por ejemplo. Los dispositivos son inherentemente sensibles, y se convierten en muy potentes cuando se acoplan a química de ligando/analito. En este caso, se desarrolla un ligando que se une específicamente al analito de interés. El ligando entonces se une químicamente a la superficie metálica y es la interacción del analito y el ligando lo que causa un cambio en la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales. Esto hace que el sistema sea específico, es decir, el ligando reacciona únicamente con el analito y otros constituyentes no contribuyen en el cambio de señal. Un laboratorio de química, por ejemplo, emplearía un sistema de SPR como una parte de un conjunto de otros instrumentos, cada uno con tendencia a cumplimentarse entre sí para un tipo particular de medición, mientras que en ocasiones proporcionan datos superpuestos. Los ejemplos de otros tipos de instrumentos y técnicas utilizados en tandem con SPR incluiría, por ejemplo, Espectroscopía de Fluorescencia, Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), Espectroscopía de infrarrojos (IR), Espectroscopía fotoelectrónica de haces X (XPS). Aunque a veces estos sistemas pueden realizar las mediciones que la SPR no puede realizar, la SPR es única en su inherente sensibilidad y con el desarrollo y especificidad de un ligando apropiado. Desarrollar ligandos que se unen de manera específica al analito de interés convierte a la SPR en una plataforma potente para la detección específica de concentraciones muy pequeñas.

55 [0005] Se han realizado intentos para desarrollar dispositivos más pequeños (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Número 7.148.968, US20100284012, CN102692397B). Sin embargo, existe aún la necesidad de sistemas de campo verdaderamente portátiles, donde ni el dispositivo ni el procedimiento de prueba necesiten instalaciones especializadas o personal entrenado y donde tales dispositivos se calibren por sí solos.

60 [0006] El documento US 2005/046854 A1 da a conocer un sensor de resonancia plasmónica de superficie para analizar un material en una muestra mantenida en pocillos de muestras, a través de lo cual cada uno de los pocillos se recubre en la parte inferior con una película metálica de SPR, se proporcionan medios de sujeción para el sensor

y se proporciona una pluralidad de fotodetectores en conjuntos lineales para detectar la distribución de la luz reflejada mediante SPR.

CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN

- 5 [0007] Se da a conocer un sistema de SPR y un aparato/dispositivo que es autónomo con su propia fuente de energía, se calibra por sí solo, tiene un procesador interno y puede conectarse de forma inalámbrica con un teléfono inteligente o un ordenador cercano para comunicar resultados o análisis adicionales. Se da a conocer adicionalmente un procedimiento para medir agentes químicos y biológicos, en concentraciones muy pequeñas, si es necesario (por ejemplo, nanomolar), con química novedosa de ligando/analito. Se puede utilizar un sistema de SPR portátil de muchas formas, y los ejemplos proporcionados en el presente documento no pretenden limitar de ninguna manera su utilidad a las mismas, sino solamente distinguir algunas configuraciones posibles de dispositivos y sensores y modalidades de funcionamiento. En el campo de batalla, un soldado puede necesitar saber si un paquete sospechoso contiene TNT (2,4,6-trinitrotolueno) antes de que los especialistas lleguen al lugar. Con un sistema de SPR portátil de campo, el soldado podría extraer una pequeña bolsa de una mochila que contiene un sistema de SPR con el tamaño de una baraja de cartas, abrir un sensor empaquetado (por ejemplo, empaquetado al vacío para no contaminarse) preparado con un ligando de TNT, introducir el sensor en una ranura del dispositivo de tamaño reducido y exponer la superficie del sensor en las proximidades del paquete en cuestión. El dispositivo respondería con un «sí» o «no» a la presencia de TNT, o en una versión más completa, con la concentración relativa de TNT.
- 10 [0008] En un laboratorio de análisis, ciencia alimentaria o lugar de fabricación o cualquier otra instalación que requiera la supervisión durante largos períodos de tiempo, la concentración de algún constituyente (por ejemplo, fructosa) debería comunicarse por horas durante un periodo de 12 horas. En este caso, el sensor se introduciría bajo control en el flujo de material (por ejemplo, un líquido). De hecho, los sensores podrían colocarse en varios lugares en diferentes puntos de fabricación.
- 15 [0009] Se da a conocer un dispositivo de SPR de tamaño reducido que puede tomar forma de una sonda, donde la parte final de la sonda se comunica con el sensor. Por razones de ahorro, una sonda puede recibir datos de múltiples sensores. Un trabajador puede conectar a intervalos la sonda con el sensor, recibir los datos sobre la cantidad de, por ejemplo, fructosa unida a la superficie del sensor en aquel momento de tiempo, desconectar el sensor de la sonda portátil dejando el sensor en su sitio bajo control en el flujo de material y pasar al siguiente sensor para recopilar los datos. Esta recopilación de datos puede enviarse (utilizando conexión inalámbrica) a un registro central en un ordenador.
- 20 [0010] Si el sistema de SPR toma forma de una sonda portátil que puede sumergirse en un vaso de solución, puede utilizarse en ensayos de campo medioambientales para probar líquidos de prueba, tales como aguas subterráneas. Los ligandos acoplados a la superficie del sensor de SPR pueden utilizarse para detectar contaminación de aguas subterráneas con metales pesados, arsénico u otros contaminantes en concentraciones muy pequeñas.
- 25 [0011] De manera particular, se da a conocer un sistema óptico para un aparato de detección que es operable en parte para determinar la concentración de especies químicas y que utiliza la resonancia plasmónica de superficie. El aparato tiene una carcasa, que puede ser portátil, estando el sistema dispuesto en o sobre la carcasa. El sistema óptico comprende un elemento sensor que incluye una capa metálica plana, siendo el elemento sensor montable de manera extraíble sobre la carcasa, los primeros elementos ópticos dispuestos en la carcasa y configurados para dirigir como mínimo un haz incidente hacia la parte trasera de la capa metálica en un rango predeterminado de ángulos con respecto a la normal a la capa, como mínimo un transductor optoelectrónico dispuesto en la carcasa, y los segundos elementos ópticos dispuestos en la carcasa y configurados para guiar como mínimo un haz reflejado, que corresponde a como mínimo un haz incidente, desde la capa metálica hasta el como mínimo un transductor optoelectrónico. En una realización particular, el haz incidente puede comprender múltiples longitudes de onda. El como mínimo un transductor optoelectrónico convierte la radiación electromagnética entrante en una señal eléctrica para la transmisión a un procesador de señales colocado en la carcasa y conectado de manera operativa con el como mínimo un transductor optoelectrónico, de tal modo que detecta un ángulo de resonancia plasmónica de superficie. Los primeros elementos ópticos se configuran de tal modo que el como mínimo un haz incidente abarca como mínimo aproximadamente 20°. El transductor optoelectrónico incluye, pero no se limita a, uno o alternativamente dos o más dispositivos transductores optoelectrónicos separados uno del otro en la carcasa. El como mínimo un haz reflejado comprende un par de partes del haz reflejado que tienen intervalos correspondientes de ángulo de reflexión separados uno del otro, mientras que los segundos elementos ópticos se configuran para dirigir una primera de las partes de haz reflejado hacia uno de los dispositivos optoelectrónicos y una segunda de las partes de haz reflejado a otro de los aparatos optoelectrónicos. Un multiplexor puede colocarse en dirección descendente de los dispositivos optoelectrónicos. Los primeros elementos ópticos incluyen un prisma y la capa metálica se dispone sobre una superficie del prisma, el prisma incluye dos primeras superficies orientadas con un primer ángulo en relación una con la otra, y las primeras superficies se orientan cada una en segundos ángulos respectivos en relación con la capa metálica. Cuando las dos primeras superficies se colocan sobre una cara de entrada o ascendente de la capa metálica, el prisma incluye, además, dos segundas superficies colocadas en una cara de salida o descendente de la capa metálica y orientadas en el primer ángulo con relación una con la otra, estando cada una de las segundas superficies orientadas a los respectivos de los segundos ángulos con relación a la capa metálica. Los primeros elementos ópticos pueden incluir, pero no se limitan a, dos o

más fuentes de haz láser, cada una configurada para dirigir un haz incidente correspondiente a la superficie del sensor a través de una correspondiente de las primeras superficies, incluyendo el como mínimo un transductor optoelectrónico como mínimo un aparato transductor optoelectrónico. Los segundos elementos ópticos incluyen, pero no se limitan a, un combinador de haces, constituyendo el transductor optoelectrónico como mínimo un dispositivo transductor electroóptico (por ejemplo, un conjunto planar individual de elementos de transductor optoelectrónico contiguos). Los primeros elementos ópticos pueden incluir una pluralidad de microlentes dispuestas en los correspondientes recorridos de haz óptico y convergiendo los correspondientes haces generadores en las líneas focales correspondientes sobre la capa metálica. Los segundos elementos ópticos incluyen de manera simultánea algo parecido a una pluralidad de microlentes dispuestas en recorridos correspondientes de haz óptico para colimar haces correspondientes que divergen de las líneas focales correspondientes.

[0012] El primer elemento óptico puede comprender un escáner que puede utilizar, por ejemplo, un dispositivo con microespejo digital. El sistema puede comprender adicionalmente uno o más sistemas de detección no SPR. Dicho sistema de detección no SPR puede utilizar, por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de ultravioleta visible, espectroscopía de impedancia, espectroscopía de reflectancia o voltamperometría cíclica.

[0013] El sistema puede comprender adicionalmente una tapa para un dispositivo de detección de resonancia plasmónica de superficie que tiene una parte con sensor que está equipado con una superficie de sensor metálica, donde la tapa incluye un elemento de cuerpo adaptado para introducirlo sobre la parte del sensor en contacto estanco del líquido con el mismo. El elemento de cuerpo incluye como mínimo un circuito capilar que incluye una perforación de entrada de microfluidos, una cámara para microfluidos que se comunica con la perforación de entrada y disponible en yuxtaposición con la superficie metálica y un drenaje de microfluidos o un canal de descarga que se comunica con la cámara. También se da a conocer un procedimiento de modulación de la longitud de una perforación de microfluidos de la tapa, en la que la perforación de microfluido es una perforación capilar, en la que dicho procedimiento comprende alterar propiedades de superficie de dicha perforación capilar. Por ejemplo, las propiedades de superficie de dicha perforación capilar se modifican recubriendo la pared interior de dicha perforación capilar con uno o más agentes activos de superficie o aplicando estimulación externa que incluye, pero no se limita a, voltaje eléctrico, radiación electromagnética y ondas acústicas.

[0014] El elemento de cuerpo de la tapa puede adaptarse para el acoplamiento con la parte del sensor de tal modo que la perforación de entrada y el drenaje o canal de descarga se comunican con el ambiente. Cuando el circuito capilar es un primer circuito capilar, el elemento de cuerpo de la tapa puede formarse con un segundo circuito capilar que incluye un canal de entrada, una cámara para microfluidos adicional que se comunica con el canal de entrada y es disponible en yuxtaposición con la superficie metálica, y un drenaje o canal de descarga adicional que se comunica con la cámara para microfluidos adicional. La tapa puede comprender entonces adicionalmente un depósito para microfluidos colocado en un extremo de la corriente superior del canal de entrada opuesto a la cámara para microfluidos adicional, contenido el depósito una solución de referencia con características predeterminadas de SPR. El depósito puede disponerse con un elemento de activación, accionador, descarga, elemento frágil, etc., para permitir la transferencia de la solución de referencia desde el depósito al canal de entrada y la cámara para microfluidos adicional.

[0015] También se da a conocer dicha tapa descrita anteriormente. Dicha tapa puede proporcionar también adicionalmente uno o más sistemas de detección que no son SPR, tal como se señala anteriormente, que pueden incluir, pero no se limita a, un sistema para espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta visible, reflectancia y/o un sistema de detección de propiedades electroquímicas, que puede utilizar voltamperometría cíclica y/o espectroscopía de impedancia.

[0016] También se da a conocer un procedimiento para detectar la presencia y/o cantidad de un constituyente diana biológico o químico en un fluido de ensayo que comprende aplicar un fluido de referencia y dicho fluido de ensayo al sistema descrito anteriormente bajo condiciones suficientes para detectar la presencia y/o la cantidad de dicho constituyente diana biológico o químico.

[0017] De manera particular, se da a conocer un procedimiento de detección que comprende (a) proporcionar un dispositivo de resonancia plasmónica de superficie que tiene una carcasa, (b) fijar una parte del sensor modular reemplazable a la carcasa, donde la parte del sensor incluye una primera capa metálica plana, (c) poner en contacto un fluido de referencia con dicha primera capa metálica, (d) a continuación, activar el dispositivo para determinar un primer ángulo de referencia de plasmón superficial para el fluido de referencia, (e) poner en contacto un fluido de ensayo con dicha primera capa metálica, (f) a continuación, activar el dispositivo para determinar un segundo ángulo de referencia de plasmón superficial para el fluido de ensayo, (g) activar un procesador de señal para determinar, a partir del primer ángulo de resonancia plasmónica de superficie y el segundo ángulo de resonancia plasmónica de superficie, la presencia de un constituyente diana biológico o químico en el fluido de ensayo, (h) eliminar la parte del sensor de la carcasa, y (i) fijar una parte diferente del sensor modular a la carcasa, donde la parte diferente del sensor modular incluye una segunda capa metálica plana. El fluido de referencia puede ser aire. El funcionamiento del procesador de señal puede incluir activar el procesador de señal de modo que pueda determinar una concentración del constituyente diana biológico o químico.

5 [0018] Cuando el fluido de referencia es un líquido, el procedimiento comprende además fijar una tapa modular de sustitución a la carcasa sobre la parte del sensor modular reemplazable de tal modo que la tapa se encuentre en contacto hermético del fluido con la parte de sensor modular reemplazable. El fluido de referencia circula o se dirige desde un depósito en la tapa hasta la primera capa metálica antes de la activación del dispositivo para determinar el primer ángulo de referencia de plasmón superficial. La disposición del fluido de ensayo en contacto con la primera capa metálica incluye arrastrar el fluido de ensayo a través de un canal capilar o de microfluidos en la tapa hacia la primera capa metálica.

10 [0019] El procedimiento comprende además proporcionar un medio de resonancia no plasmónico o más particularmente un dispositivo y determinar la presencia y, opcionalmente, la concentración de un constituyente diana biológico o químico en dicho fluido de ensayo y comparar los resultados obtenidos utilizando SPR con dichos medios no SPR. Más específicamente, se da a conocer un procedimiento de funcionamiento de un dispositivo, en particular, un dispositivo de detección de SPR, un dispositivo para medir señales de SPR para detectar la presencia de un constituyente de fluido. El dispositivo comprende una carcasa y primeros elementos ópticos dispuestos en la carcasa que incluyen una fuente de radiación electromagnética y comprende además segundos elementos ópticos colocados en la carcasa e incluye como mínimo un transductor optoelectrónico. El dispositivo incluye, también, un procesador de señal dispuesto en la carcasa y conectado de manera operativa con el como mínimo un transductor optoelectrónico. El procedimiento comprende (i) fijar una parte de sensor en la carcasa, donde la parte de sensor incluye una capa metálica plana, (ii) poner en contacto un fluido de referencia con la capa metálica, (iii) a continuación, activar los primeros elementos ópticos para dirigir como mínimo un haz incidente hacia una parte trasera de la capa metálica con un intervalo predeterminado de ángulos con respecto a la normal de la capa, (iv) activar los segundos elementos ópticos que incluyen como mínimo un transductor optoelectrónico para detectar la intensidad de reflexión en función del ángulo de reflexión para el fluido de referencia, (v) generar una primera señal eléctrica que codifica la intensidad de reflexión para el fluido de referencia, (vi) activar el procesador de señal para detectar a partir de la primera señal eléctrica un primer ángulo de resonancia plasmónica de superficie para el fluido de referencia, (vii) almacenar el primer ángulo de resonancia, (viii) poner en contacto un fluido de ensayo con la capa metálica, (ix) a continuación, activar los primeros elementos ópticos para dirigir como mínimo un haz incidente hacia una parte trasera de la capa metálica con el intervalo predeterminado de ángulos con respecto a la normal de la capa, (x) activar los segundos elementos ópticos que incluyen el como mínimo un transductor optoelectrónico para detectar la intensidad de reflexión en función del ángulo de reflexión para el fluido de ensayo, (xi) generar una segunda señal eléctrica que codifica la intensidad de reflexión para el fluido de ensayo, (xii) activar el procesador de señal para detectar a partir de la segunda señal eléctrica un segundo ángulo de resonancia plasmónica de superficie para el fluido de ensayo, y (xii) adicionalmente activar el procesador de señal para determinar, a partir del primer ángulo de resonancia plasmónica de superficie y el segundo ángulo de resonancia plasmónica de superficie, la presencia de un constituyente diana biológico o químico en el fluido de ensayo. El como mínimo un haz incidente abarca como mínimo aproximadamente 20°. El dispositivo además de ser un dispositivo de SPR puede ser también un dispositivo para realizar mediciones no SPR o alternativamente, generar datos no SPR (por ejemplo, fluorescencia, IR, UV/visible, propiedades electroquímicas). El procedimiento comprende dirigir como mínimo un haz incidente hacia la parte frontal de dicha capa metálica para generar una señal no SPR o estimulante de energía. La fuente estimulante de energía puede ser una señal eléctrica, microondas y ultrasonido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 [0020]

FIGURA 1 es un diagrama esquemático de un sistema óptico genérico o conocido para la detección con resonancia plasmónica de superficie (SPR).

FIGURA 2A es un diagrama de bloques del dispositivo de SPR descrito.

50 FIGURA 2B es una representación tridimensional de dicho dispositivo de SPR.

FIGURA 3 es un diagrama que muestra como diferentes líneas de absorción de SPR ocupan diferentes posiciones en una imagen en un detector óptico.

FIGURA 4A es un diagrama de un sistema óptico que mide una respuesta por SPR de una gota de una solución acuosa.

55 FIGURA 4B muestra una ubicación relativa de una línea de absorción de SPR en una imagen generada por el sistema de la FIGURA 4A.

FIGURA 5A es un diagrama de un sistema óptico que mide una respuesta por SPR de aire.

FIGURA 5B muestra una ubicación relativa de una línea de absorción de SPR en una imagen generada por el sistema de la FIGURA 5A.

60 FIGURA 6A es un diagrama de un sistema óptico para obtener señales de SPR tanto para aire como un líquido, tal como agua.

FIGURA 6B muestra una ubicaciones relativas de dos líneas de absorción de SPR en una imagen generada por el sistema de la FIGURA 4A.

65 FIGURA 7A es un diagrama de otro sistema óptico para obtener señales de SPR tanto para aire como un líquido, tal como agua.

FIGURA 7B muestra ubicaciones relativas de dos líneas de absorción de SPR en una imagen generada por el sistema

de la FIGURA 4A.

FIGURA 8 es un diagrama, a una escala aumentada muchas veces de un prisma sensor 406, que muestra líneas de señales de SPR (recuadro) y recorridos de haces asociados para obtener señales de SPR tanto para aire como para un líquido, tal como agua.

5 FIGURA 9A es un diagrama de otro sistema óptico para obtener señales de SPR tanto para aire como para un líquido, tal como agua.

FIGURA 9B muestra tres campos de imagen, representando cada uno ubicaciones relativas de dos líneas de absorción de SPR en una imagen generada por el sistema de la FIGURA 9A.

FIGURA 10 es una visión en sección transversal esquemática de un dispositivo de SPR con una tapa microfluídica.

10 FIGURA 11 es una visión en sección transversal esquemática de un dispositivo de SPR con otra tapa microfluídica. FIGURA 12 es un esquema de un dispositivo combinado.

FIGURA 13 es un esquema de una tapa que incorpora sistemas de detección de SPR y fluorescencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

15 [0021] A continuación, se describirá el sistema con más detalle a modo de ejemplo con referencia a las realizaciones mostradas en figuras adjuntas. Se debería tener en cuenta que las siguientes realizaciones descritas se exponen solamente a modo de ejemplo y no deberían interpretarse como que limitan el concepto de la invención a alguna configuración física particular.

20 [0022] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de aquel intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado se contemplan dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños y se contemplan dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos de aquellos límites incluidos, se incluyen también en la invención.

30 [0023] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede utilizar también cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o la prueba de la presente invención, se describen a continuación los procedimientos y materiales preferidos.

35 [0024] Debe señalarse que tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el/la» incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 [0025] A menos que se indique lo contrario, el término «como mínimo» que precede a una serie de elementos debería entenderse como que hace referencia a cada elemento en la serie. Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, utilizando no más que una experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. La presente invención pretende abarcar tales equivalentes. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra «comprender» y las variaciones, tales como «comprende» y «que comprende» se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Por consiguiente, los términos «que comprende», «que incluye», «que contiene», «que tiene», etc. deberían leerse ampliamente o de manera abierta y sin limitación. Los términos «película de capa delgada de metal», «película delgada metálica», «capa de metal», «película metálica» se utilizan de manera intercambiable.

50 [0026] Las FIGURAS 1, 4A y 5A muestran un sistema de SPR que comprende óptica de entrada 10 que genera un haz incidente convergente 12 y dirige el haz hacia una superficie posterior 14 o la parte inferior de una película delgada de metal 16 depositada sobre un sustrato óptico 17 (por ejemplo, vidrio) con un índice de refracción R1 para la detección cualitativa de la presencia y, opcionalmente, una detección cuantitativa de la concentración de un analito (ión, molécula, partícula viral, etc.) de interés. El medio que se encuentra en contacto con y está definido como la parte superior de la película delgada de metal tiene un índice de refracción R2. Un haz de reflexión divergente 18 se captura y es enfocado por la óptica de salida 20 sobre un transductor optoelectrónico 22, típicamente un dispositivo acoplado de carga que tiene un conjunto de elementos ópticos pixelados planos o en 2D. Tal como se señala anteriormente y se establecerá con más detalle a continuación, la FIGURA 1 muestra un sistema de SPR genérico, la FIGURA 4A es un diagrama de un sistema óptico que mide una respuesta por SPR de una gota de solución acuosa y la FIGURA 5A es un diagrama de un sistema óptico que mide una respuesta por SPR de aire.

Portabilidad de Campo

65 [0027] La Patente de EE. UU. 7.395.103 de Cappo et al describe un dispositivo portátil de SPR utilizado como una sonda para medir constituyentes en la película lagrimal. Otros describen sistema de SPR en miniatura que se convertirían en portátiles simplemente basándose en su tamaño, incluso si no estaban destinados para ello.

5 [0028] En presente documento se da a conocer un sistema de SPR portátil de tamaño reducido que incorpora y supera las características de un instrumento de laboratorio. Se necesita una versión mejorada de una versión de laboratorio, ya que el uso de un instrumento analítico sensible, tal como SPR, en el campo requiere una atención específica para asegurar una medición precisa en condiciones inferiores a las ideales.

10 [0029] Un diagrama de bloques del presente sistema en miniatura se muestra en la FIGURA 2A y una representación tridimensional se muestra en la FIGURA 2B. Un «extremo frontal» o parte del sensor 110 se acopla a una carcasa 112 de la unidad y se pone en contacto con una solución o fluido de ensayo y proporciona un medio para distribuir la solución sobre una superficie del sensor 114. La parte del sensor 110 contiene la superficie del sensor 114, típicamente una capa de 50 nm de oro depositada al vacío en el vidrio sobre una capa delgada (~2 nm) de cromo u otro material de recubrimiento inferior de tal modo que el oro se adhiera bien. El «vidrio» puede ser cualquier otro material transparente a las longitudes de ondas que se aplican (por ejemplo, plástico) con facetas reflectantes (que incluyen aquellos que funcionan bajo la reflexión interna total), de tal modo que el ángulo de incidencia de la luz incidente se encuentra dentro del rango del fenómeno de SPR para que tenga lugar en las condiciones indicadas (índice de refracción, material del sensor, longitud de onda, etc.). Una fuente de láser 116 (por ejemplo, diodo de láser visible a 633 nm del paquete TO de tipo 3,8 mm o 5,6 mm) en la carcasa 112 produce un haz de láser de interrogación. Un sistema óptico ascendente o de entrada 118 condiciona el haz láser en el perfil espacial y libera el haz hacia la superficie o la capa de sensor 114 para interrogar las moléculas unidas o adsorbidas y un sistema óptico descendente o de salida 112 con óptica de visualización dirige un haz reflejado hacia un sensor optoelectrónico (no se muestra independientemente en la FIGURA 1) o un conjunto plano focal, tal como un dispositivo de acoplamiento de carga que es monocromático (puesto que tiene solamente una longitud de onda), de alta resolución («HD»), con tamaño de píxeles pequeños (~1 micrón). Un sensor de visualización con estas características permite al aparato tener una alta afinidad en la detección de cambios pequeños de concentración, dado que el movimiento de línea de SPR puede detectarse hasta un grado muy pequeño. De manera adicional, en el extremo frontal se monta un sensor de temperatura 122 que recopila los datos de temperatura en una o más posiciones en o alrededor de la superficie del sensor 114 y proporciona un bucle de retroalimentación para el refrigerador termoeléctrico para mantener una temperatura constante. Una unidad de procesamiento de señal 124 se activa mediante un microprocesador, ordenador u otro elemento electrónico y recibe una señal de visualización de vídeo desde el conjunto plano focal de la óptica de salida 120. El software configura la unidad de procesamiento de señal 124 para procesar los datos de visualización de vídeo sin procesar para determinar con precisión el mínimo del ángulo de SPR. Los datos de temperatura del sensor 122 se suministran para los cálculos mínimos de SPR en tiempo real para corregir las variaciones de temperatura durante el proceso de medición. Adicionalmente, una señal de referencia, determinada a partir de un fluido de referencia (por ejemplo, aire), se almacena en una memoria 126 y se proporciona de manera simultánea al procesador de señal 124 para producir un resultado de valor único (es decir, concentración) informando de la diferencia entre la señal de SPR de la muestra o el fluido de ensayo diana y la del fluido de referencia. La unidad de procesamiento de señal 124 puede conectarse por vía inalámbrica a través de un transmisor 128 a un teléfono inteligente o un ordenador cercano (no se muestra) para transmitir resultados, mantener registros y/o análisis adicional. Alternativamente o adicionalmente, el aparato puede disponerse con una pantalla 130 conectada al procesador de señal 124 para proporcionar un informe de resultados de ensayo a un usuario.

45 [0030] En la práctica, para que una unidad portátil contenga todas las características anteriores, la mayoría de los componentes son de tamaño reducido, los cuales se encuentran dentro del estado actual de la técnica en los campos respectivos. La FIGURA 2B muestra un modelo tridimensional de los componentes empaquetados en un dispositivo portátil y representados en el diagrama de bloques de la FIGURA 2A.

Autorreferencia

50 [0031] La técnica de medición utilizada en SPR se realiza principalmente en relación con una solución de referencia o tampón. En otras palabras, cuando se realiza una medición en un laboratorio en un aparato de SPR de mesa, los fluidos se bombean a través de tuberías y se ponen en contacto directo con la superficie sensorial a través de un pequeño canal de flujo. Este canal sería parte de un ensamblaje que abarca la superficie del sensor (definida como la parte superior de la película delgada metálica donde se unen los ligandos) con sellados apropiados para prevenir fugas y a la que se refiere como una *celda de flujo*. Una medición típica implicaría por tanto pasar una solución tamponada sobre la superficie del sensor, seguida del fluido a medir. El registro de datos se realizaría en función del tiempo, y primero se obtendría una señal para el tampón y después un cambio en la señal para el fluido al que se está realizando la prueba. Si las mediciones posteriores inyectadas a la superficie del sensor se realizasen sobre el fluido con concentración similar, pero mayor en concentración, cada uno mostraría un cambio en la señal proporcional a la concentración. El cambio en la señal de los datos procesados es representativo de un cambio en el ángulo de SPR. Si la concentración de cada solución medida fuese conocida, la respuesta de SPR en función de la concentración se podría documentar y cuando una concentración desconocida se midiera bajo las mismas condiciones, podría determinarse su concentración.

65 [0032] Un sistema convencional de SPR de laboratorio no sirve en el campo, dado que es voluminoso, necesita alimentación CA, se acopla a un ordenador de mesa y tiene un acoplamiento adicional de un sistema de celda de flujo. En un sistema portátil de campo en comparación con un conjunto de laboratorio, no conviene un sistema de celda de

flujo, dado que añade componentes extras (bomba, tubos) y se prefiere simplemente sondar un líquido con el sensor en la punta de la sonda. Sin embargo, dado que la SPR es una medición relativa, existe la necesidad de alguna base de referencia para determinar la concentración. Como ejemplo, se supone que se desea determinar con precisión la concentración de sal en agua. En un sistema de mesa de laboratorio con una celda de flujo, se realizarían soluciones salinas de precisión y circularían a través de la superficie del sensor produciendo una serie lineal de puntos de datos de cambio de ángulo de SPR frente a la concentración de sal. Cuando una cantidad desconocida pasa sobre la superficie sensible, se podría deducir a partir de los datos empíricos la concentración de la cantidad desconocida evaluando donde entre el grupo de datos conocidos se encuentra el punto de dato desconocido. Por ejemplo, las concentraciones que oscilan entre 500 mM y 600 mM en etapas de 10 mM de agua salada producirán un conjunto de puntos de datos con el aumento del ángulo de SPR en este rango. Si se inyecta una solución desconocida de 552 mM de agua salada, este punto de dato se encuentra entre 550 mM y 560 mM de las soluciones de calibración. Con cierto procesamiento de datos, se puede predecir el valor de la solución desconocida.

[0033] En una situación de campo, es posible sumergir una sonda en una solución tamponada o de calibración, pero es muy inconveniente. Esto requiere un procedimiento de medición en dos etapas y se debería transportar una solución externa y mantenerla libre de contaminantes. Antes de que se realicen las mediciones, el sensor se manipula para entrar en contacto con la solución, se registra una lectura y se guarda en el aparato, y, a continuación, se realiza la medición real poniendo en contacto el sensor con la solución desconocida.

[0034] Un sistema de autorreferencia o autocalibración es particularmente ventajoso en un sistema portátil de campo. Esto puede realizarse de diferentes maneras dado que las señales de referencia pueden generarse por agua (FIGURAS 4A, 4B), alguna otra solución o incluso a partir de aire del entorno de la superficie del sensor (FIGURAS 5A, 5B). A modo de ejemplo de como las señales de SPR cambian en función del medio en contacto con la superficie sensible, si agua con un índice de refracción R3 entra en contacto con la superficie del sensor, el ángulo de incidencia en el que tiene lugar el fenómeno de SPR es de 55 grados respecto a la normal de la superficie del sensor (FIGURA 4A). A este ángulo, la luz se absorbe casi por completo en la película delgada metálica (por ejemplo, oro) y la reflexión resultante muestra una intensidad casi nula. Los fluidos distintos de agua con índices de refracción considerablemente diferentes, (R2) tales como etanol, por ejemplo (utilizando los estándares de SPR, la diferencia en el índice de agua 1,33 y etanol 1,36 es muy grande, dado que las mediciones de SPR se confinan típicamente al cambio de posición de la 4^a y la 6^a cifra decimal) muestran un cambio grande en la posición de señal dado que el ángulo de incidencia, en el que tiene lugar el fenómeno de SPR, puede ser de 43 grados. (Véase la FIGURA 3 que muestra diferentes líneas de señales de SPR). Superar este cambio con un índice de refracción más grande producirá una señal más allá de 43 grados, y puede provocar que el instrumento salga del intervalo con un intervalo dinámico típico de +/- 10 grados, y, de manera general, los sistemas ópticos de SPR se diseñan con la previsión de detección de líquido dentro de un intervalo general de detección en el ángulo de SPR de 45-65 grados centrado en 55 grados.

[0035] La SPR puede tener lugar cuando el medio circundante es aire cuyo índice de refracción es de 1,0 - R2 en la FIGURA 5A y en ausencia de la gota de agua en la Figura 4A - produce un mínimo de SPR de 33 grados (FIGURA 5A), que se encuentra lejos de la mayoría de los mínimos de SPR en líquido. Sin embargo, esta señal mínima de SPR de aire puede utilizarse como un punto relativo de calibración para la medición y puede registrarse inmediatamente antes de la medición.

[0036] En este caso, el sistema de SPR está diseñado de tal modo que captura de manera simultánea la señal de SPR de aire y de agua, y se realiza una medición relativa con aire funcionando como base de referencia. Esto produce un sistema extremadamente práctico y conveniente: tan pronto como un sensor nuevo se introduce en el instrumento portátil de campo, se puede obtener inmediatamente su señal de referencia del aire circundante, y, a continuación, proceder con la medición de un analito de interés. La diferencia entre estas dos señales se compara con un conjunto de datos de calibración (que consiste en diferencias entre señales de SPR de aire y señal de SPR de concentración creciente del analito) y se determina la concentración desconocida.

[0037] Otras ventajas para un sistema de autorreferencia se relacionan con tolerancias de fabricación de la óptica del sensor y el sistema mecánico utilizado para mantener la óptica del sensor en el instrumento. A diferencia de un sistema de mesa en el que con un sistema de celdas de flujo pueden utilizarse sensores para realizar múltiples experimentos enjuagando sin intervenir físicamente con el hardware, en un sistema portátil de campo se contempla que los sensores se cambien típicamente antes de cualquier medición, ya que con la ausencia de un sistema de flujo no habría ningún medio para enjuagar la superficie del sensor. Esto significa que las mediciones relativas son más difíciles sin un sistema de autorreferencia en el que la extracción y la inserción de un sensor podrían interpretarse como un cambio en la señal de SPR dado que el cambio es típicamente muy pequeño. En otras palabras, no se pueden realizar mediciones fiables utilizando un sensor para una señal de referencia, extraerlo e insertar otro sensor para la medición del analito.

[0038] Para demostrar con más claridad la ventaja, se considera probar dos concentraciones de analito con un dispositivo portátil de campo, y en cada una de estas mediciones en ausencia de un sistema de celda de flujo y como conveniencia necesaria, el sensor debe cambiarse por uno nuevo en las segundas mediciones. El procedimiento sería el siguiente: el dispositivo se enciende, y se abre un nuevo sensor de su embalaje libre de contaminación y se introduce en el dispositivo. El dispositivo captura una señal de aire y una señal de analito (1). El sensor se extrae y se descarta

y el procedimiento se repite con el segundo sensor nuevo que captura la señal de aire y la señal de analito (2). En la práctica, el cambio en el ángulo de SPR es increíblemente pequeño, cuando se comparan dos concentraciones que están próximas. Sin la señal de aire de autorreferencia, el hecho de extraer un sensor e insertar uno nuevo podría confundir la medición y es probable que las dos señales de SPR de cada una de las mediciones probablemente no 5 tengan correlación con sus concentraciones. La extracción del sensor y la inserción de uno nuevo puede dar lugar a que la segunda superficie se encuentre en la misma posición que la primera y pueda desplazarse o inclinarse (el propio sensor tiene tolerancias de fabricación que podría causarlas). Como resultado, el haz de luz que golpea la superficie del sensor se encontrará en un ángulo diferente del primer sensor, por lo tanto, el ángulo de reflexión o de SPR no 10 será representativo del cambio de concentración en relación con el primero y contendrá, también, información de desalineación, lo que es indeseable. Aunque las tolerancias de fabricación pueden mantenerse pequeñas para superar 0,1 mm, los cambios en el ángulo de SPR son fracciones de un grado en la 3^a y la 4^a cifra decimal para cambios típicos 15 en concentraciones de interés. Dado que las tolerancias excesivamente ajustadas son difíciles e poco prácticas, un sistema de autorreferencia se convierte en una necesidad.

15 **[0039]** El desafío de un sistema práctico que pueda capturar tanto una señal de SPR de aire como una que se encuentra dentro del rango de agua, hace referencia a las demandas expuestas sobre el sistema óptico y el sistema de detección. La diferencia entre la señal de SPR en agua y aire es bastante grande y tiene relación directa con la dispersión angular del haz de luz incidente.

20 **[0040]** En el diseño de sistemas modernos de SPR, con referencia a la FIGURA 1, una película de capa delgada metálica 16 se deposita al vacío sobre el vidrio 17 con un índice de refracción R1 a un grosor de 50 nm y se interroga desde la parte trasera o inferior 14 (siendo una cara frontal o superior o una cara de película delgada metálica 24 cuando se acopla el ligando y el analito entra en contacto) con luz monocromática (o pseudomonocromática). Con un 25 ángulo particular de incidencia hacia la cara inferior de la superficie de la película delgada metálica, el fenómeno de SPR tiene lugar y se absorbe toda la luz incidente en ese ángulo en la película delgada metálica, por ejemplo, película delgada de oro. Cuando se miden las muestras con un índice de refracción de R2, el ángulo de aparición de SPR ("SPR(θ)") se desconoce y es el parámetro de interés. Los primeros sistemas de SPR rastreaban un haz de láser único 30 en varios ángulos para sondar la superficie del sensor y determinar la SPR(θ), el ángulo en el que la intensidad de haz reflejado disminuía hasta casi cero. Los sistemas típicos modernos utilizan un haz convergente de luz 12 que impacta sobre la parte trasera 14 de la película delgada metálica 16 que sonda todos los ángulos dentro del cono convergente de luz o Apertura Numérica (AN = $\sin(\theta/2)$). De manera ideal, un cono de luz que cubre los ángulos de SPR(θ) 35 esperados para agua, disolventes, aire y gases, etc. proporcionaría flexibilidad principal. Las limitaciones prácticas impiden esto debido a que se necesita un cono limitado de luz, así como también consideraciones del tamaño, complejidad y coste de los componentes ópticos. Producir un haz convergente 12 de alta calidad con un ángulo muy amplio de cobertura no es trivial. Además, el sistema de detección que es típicamente un conjunto de detectores bidimensionales (por ejemplo, cámara CCD o CMOS) se fabrica en determinados tamaños (por ejemplo, 1/2" CCD es 4 mm x 6 mm) y un haz reflejado con ángulo amplio una vez recolimado, desbordaría el área de detector relativamente pequeña. Esto puede compensarse con la óptica de compresión desmagnificando la imagen para adaptarla al detector 40 22, sin embargo, la resolución sufriría, dado que el movimiento de la imagen de señal de SPR cubriría menos píxeles.

45 **[0041]** Para evitar esto, la investigación basada en los sistemas de SPR con un ángulo de cono razonable (-AN=0,2) podría de hecho rotar el prisma de SPR sobre la posición centrada en la parte frontal de la superficie del sensor y de manera simultánea rotar el detector (a una velocidad 2x debido a la reflexión) para captar la imagen reflejada. Esto permite captar la mayoría de SPR(θ) de manera virtual y ciertamente aire y líquido.

50 **[0042]** Un pequeño sistema portátil de mano, sin embargo, no puede permitirse el lujo de ninguna pieza móvil. Existen varias configuraciones descritas en el presente documento de un sistema óptico y de detección que pueden facilitar una dispersión angular grande de los haces incidente y de reflexión en un sistema de SPR que permita un rango dinámico grande (rango grande de SPR(θ)) del instrumento. Otras configuraciones descritas en el presente documento permiten un rango dinámico convencional con el beneficio añadido de capturar una señal bien fuera del rango dinámico (es decir, una señal de aire fuera del rango dinámico de líquidos con índices de refracción cercanos a los de agua). La dispersión angular eficaz del haz o haces incidentes es suficiente para capturar una señal de referencia de aire (con índice de refracción R2=1,0) y una señal de muestra de líquido de ensayo (con índice de refracción R3).

55 **[0043]** Tal como se muestra en la FIGURA 3, una señal de SPR aparece como una línea oscura en un campo brillante sobre el plano del detector. Las líneas oscuras representan la absorción de luz en la película delgada metálica y el campo brillante es la reflexión de otros ángulos de la luz desde la parte inferior de la película delgada metálica. Tal como se representa en las FIGURAS 4A y 4B, capturar una señal de SPR de agua pura (R3 = 1,33) necesita un ángulo de incidencia (con respecto a la normal de la superficie) de aproximadamente 55 grados; de aire, aproximadamente 33 grados (FIGURAS 5A y 5B). Esto significa que el rango angular del haz incidente necesita ser de como mínimo aproximadamente 20 grados, o, alternativamente, aproximadamente 22 grados o como mínimo aproximadamente 28 grados. Esto implica una apertura numérica de 0,24. Dado que el dispositivo portátil es pequeño, el diámetro del haz láser es ~2 mm y, como tal, las lentes de enfoque para producir el haz convergente serían de como mínimo este diámetro. A partir de geometría simple, la distancia focal de estas lentes utilizando una AN de 0,24 sería de $f = 4\text{mm}$ y $f/\# = 2$. Es un sistema óptico relativamente rápido, si se utilizan lentes simples (elemento único) y, por

tanto, el rendimiento sufriría en la calidad de imagen final. Se necesitarían lentes con multielementos para corregir anomalías.

[0044] Las FIGURAS 6A y 6B muestran un sistema 300 con detectores dobles 302 y 304 que proporcionan señales de salida a un multiplexor 306 (MUX). El sistema 300 incluye, para un sistema óptico de f/2, es decir, uno con un ángulo de convergencia suficientemente grande que cubriría tanto la señal de SPR para aire ($R2 = 1,0$) como la señal de SPR para una solución ($R3$ reemplaza $R2$), la óptica de entrada y salida bien corregida 308 y 310. Típicamente se utilizan lentes cilíndricas 312 y 314 debido a que un sistema óptico de SPR genera un haz convergente o de entrada 316 en un sustrato óptico 317 emitiendo una línea enfocada a la parte inferior de la película delgada metálica 318, y, como tal, las ópticas de entrada y de salida 308 y 310 incluyen lentes con multielementos (dobletes o tripletes) o incluso lentes acilíndricas (equivalente cilíndrico asférico) 312, 314. Con un haz de entrada 316 formando un ángulo convergente suficientemente grande sobre la superficie del sensor 318, la reflexión será igual y contraria para producir un haz de salida divergente con una forma simétrica 320 y la colimación de este haz por la óptica de salida 310 produce un diámetro relativamente grande, más grande que una dimensión típica del detector (sensor CCD o CMOS). Aunque la compresión del haz reflejado puede conseguirse con lentes adicionales (expansor de haz inverso), la resolución se reduciría. La captura de señales de SPR se logra mediante 2 sensores o detectores de imagen bidimensional 302 y 304, uno para la señal de referencia de SPR de aire ($R2 = 1,0$) y uno para la señal de SPR de la solución que está a prueba ($R3$) 522. Las dos señales de imagen se combinan utilizando un multiplexor 306 y se suministran al procesador de señales (124, FIGURA 2A y B).

[0045] Las Figuras 7A y 7B muestran un sistema 350 con un único detector de imagen 352 y con un combinador de haz óptico 354. La óptica de entrada de multielementos 356 dirige un haz de entrada convergente 358 a través del sustrato óptico con un índice de refracción $R1$ sobre la parte inferior 360 de una película delgada metálica 362, mientras que un haz de salida divergente 364 se colima utilizando óptica de salida de multielementos 366 para formar un haz amplio paralelo 368 que transmite la señal de SPR para una referencia con índice de refracción $R2$ (por ejemplo, aire) y en el momento inmediatamente posterior, un fluido de ensayo con índice de refracción $R3$ (por ejemplo, una solución acuosa). El haz 368 se combina ópticamente al utilizar el cubo combinador de haz óptico (divisor de haces) 354.

[0046] En un enfoque alternativo representado en la FIGURA 8, las facetas o superficies que se reflejan de forma interna 402 y 404 sobre una parte de entrada de un prisma sensor 406 que es un sustrato óptico con un índice de refracción $R1$ emite un haz convergente o de entrada 408 a la parte inferior de una película delgada metálica 410 y están compuestos o relativamente inclinadas. La parte opuesta o superior de la película delgada metálica se encuentra en contacto con el índice de refracción $R2$. La cara de entrada de doble faceta puede emitir una primera parte 412 del haz de entrada 408 con un ángulo de incidencia nominal de 33 grados y una segunda parte 414 del haz de entrada 408 con un ángulo de incidencia nominal de 55 grados. Las facetas de salida 416 y 418 del prisma sensor 406 son imágenes especulares de las facetas de entrada 402 y 404 y transmiten a un conjunto de detectores 420 dos señales de SPR distintas 422 y 424 generadas por las muestras con índices de refracción $R2$ y $R3$ separadas por una distancia distingible 426. El haz de entrada 408 puede generarse a partir de los haces de fuente doble 428 y 430. En este caso, una fuente de luz 432 emite el haz de luz 428 a la faceta o superficie del prisma 402 del prisma de SPR para producir una parte de haz 412 con un ángulo de incidencia con respecto a la normal de la película delgada metálica 410 de 33 grados. Otra fuente de luz 434 (opcionalmente una fuente única dividida en dos) desplazada horizontalmente de la primera fuente 432 emite el haz de luz 430 a la faceta o superficie del prisma 404, de tal modo que el ángulo de incidencia de la parte de haz 414 con respecto a la normal de la película delgada metálica es de 55 grados. En un enfoque alternativo, el haz de entrada 408 es un haz único ampliamente suficiente para cubrir ambas facetas 402 y 404 en un disparo. Es de estas maneras que las dos señales de SPR, una de referencia y una de medición, se emiten de manera simultánea al conjunto de detectores 420 y se procesan, de tal modo que la medición resultante implicaría la medición y la diferencia en el espaciado de píxeles entre las dos y cuando se comparan con una tabla de calibración puede medirse con precisión la concentración de muestra desconocida.

[0047] En lugar de utilizar la señal de SPR de aire, podría mantenerse una solución de calibración separada en un vial dentro de la cabeza del instrumento que se liberaría justamente antes de la medición. Este tipo de enfoque es más adepto del sistema de baño microfluídico descrito a continuación que hace referencia a la FIGURA 11.

[0048] Las FIGURAS 9A y 9B muestran una técnica para autorreferencia que incluye conjuntos de microlentes lenticulares de entrada y salida 450 y 452 para emitir y capturar luz desde una superficie de película delgada metálica 454. Un haz colimado de luz 456 entra en un conjunto de lentes lenticulares (cilíndricas) 450. Esto produce haces convergentes 458, 460, 462 que generan múltiples imágenes de líneas centradas sobre la parte inferior de superficie de película delgada metálica 454, cada uno capaz de generar su propia señal de SPR. Tras la reflexión, los haces divergentes respectivos 464, 466, 468 se envían a un conjunto lenticular 452 que colima cada haz respectivamente en 470, 472, 474, enviando múltiples señales de SPR a un detector 476. Si el sistema de SPR se configura según la configuración convencional de Kretschmann, el diseño del conjunto lenticular 450 requiere que cada elemento de lente 450 tenga una longitud focal creciente para adaptarse a la superficie inclinada. Con la sectorización apropiada, se podría utilizar un haz 458, 460 o 462 para muestra de referencia (se muestra como aire con el índice de refracción $R2$) y los otros para muestras de ensayo 476 y 478 con índices de refracción $R3$ y $R4$, generando una señal de referencia de SPR 480 y señales de muestras de ensayo 482 y 484 en la Figura 9B. De hecho, dependiendo del número de elementos de lentes 450 y 452 se pueden obtener múltiples lecturas de diferentes soluciones junto con una señal de

referencia. Esto podría realizarse como una modificación apropiada del diseño de un sistema microfluídico descrito a continuación, y para obtener la especificidad para cada canal (señal de SPR), se aplica un ligando separado a partes diferente de la superficie de película delgada metálica 454. Esto facilita la detección de múltiples analitos en un proceso de medición único (FIGURA 9B) todo realizado en el mismo periodo de tiempo. La captura todas las señales de SPR en exactamente el mismo periodo de tiempo podría demostrar que es un aspecto importante de un sistema de medición precisa. Dado que la SPR es una técnica extremadamente sensible, si la referencia o la muestra cambia con el tiempo como resultado de fuerzas externas (por ejemplo, se produce contaminación activa debido al entorno local), entonces la captura de señal simultánea eliminaría variables relacionadas con el tiempo produciendo una medición más precisa tras comparar las señales con la referencia o entre sí.

[0049] Aunque las partes móviles se han considerado poco prácticas, un escáner para cubrir el rango necesario podría emplear un dispositivo con microespejo digital (DMD). Estos son dispositivos semiconductores pequeños que tienen un conjunto rectangular de espejos de tamaño micro que pueden girar de manera individual. En este caso, el láser impactaría en el DMD y la electrónica controlaría los microespejos para rastrear el haz a lo largo del rango de ángulos para señales de SPR de la referencia y la muestra.

[0050] Otro medio de autorreferencia puede ser el uso de múltiples longitudes de onda en el haz de fuente de SPR. El ángulo de SPR, donde tiene lugar la absorción, depende de la longitud de onda. Por ejemplo, si se utilizan dos láser uno rojo y uno verde en haces incidentes solapantes mediante la utilización de un cubo combinador de haces, la SPR(θ) para rojo sería diferente de la del verde y daría lugar a dos líneas oscuras en la imagen, tal como se muestra en la Figura 7B. La separación entre estas dos señales se usaría como referencia. Sin embargo, al contrario de la señal de aire u otra solución de calibración en relación a la solución a prueba, en la que la separación entre las dos líneas oscuras es grande, las señales de diferentes longitudes de ondas se encuentran casi encima una de la otra. La distancia depende de la longitud de onda (puede utilizarse cualquier longitud de onda en la SPR desde ultravioleta hasta visible hasta infrarroja), pero en la práctica, puede ser difícil discernir las dos señales entre sí. Sin embargo, utilizar dos longitudes de onda a través del sistema puede proporcionar información de calibración (o superposición) útil con un aumento insignificante en el coste del dispositivo.

Sonda de inmersión

[0051] Para utilizar de forma conveniente un sistema de SPR portátil en el campo para probar líquidos recogidos, se prefiere que sea posible sumergir la punta portátil en el líquido. La sonda de SPR descrita por Cappo et al en la Patente de EE. UU. 7.395.103, es una sonda de tipo de contacto, es decir la superficie del sensor está diseñada para un contacto momentáneo con un superficie húmeda y se realiza una medición tras el contacto. Una sonda de contacto presenta dificultades cuando la muestra es un recipiente lleno de líquido, por ejemplo. Las superficies del sensor de SPR son típicamente planas y bordeándolas están algún tipo de facetas de reflexión para dirigir la luz entrante al ángulo más apropiado para que tenga lugar la SPR. La patente '103 describe una superficie del sensor con dos superficies con pendiente que se utilizan bajo reflexión interna total como superficies especulares para emitir luz al sensor y reflejarla al detector. Si se sumergiera esta superficie sensible en el recipiente de muestra solamente debería producirse contacto del líquido y la superficie del sensor; si el líquido entra en contacto con las facetas, rompería la reflexión interna total y la luz no se reflejaría más hacia la superficie sensible o el detector. Incluso si estas superficies con pendiente se cubrieran con una película delgada reflectante (por ejemplo, aluminizada), debido al tamaño pequeño y el ajuste perfecto de los componentes, el líquido que toca las facetas o caras del prisma sensor podría absorberse en el dispositivo mediante acción capilar causando un daño catastrófico al instrumento.

[0052] Los instrumentos convencionales y comerciales de SPR utilizan de manera típica una «celda de flujo» para suministrar líquido a la superficie del sensor que consiste en un sistema de bombeo para arrastrar el líquido desde un recipiente a través de tubos a un puerto que conduce a una celda o cámara pequeña con un extremo abierto en contacto directo con la superficie sensible. El líquido se empuja o fluye a través de la cámara al activar la bomba por un puerto de salida a un tubo y generalmente a un contenedor de residuos. Utilizando este sistema el investigador puede hacer fluir posteriormente varios líquidos a través de la superficie y registrar los cambios dinámicos en la señal de SPR que puede relacionarse de nuevo con cosas, tales como la unión y disociación molecular. Los diferentes líquidos pueden cambiarse a través de diversos sistemas o simplemente colocando el tubo en diferentes recipientes mientras que la bomba esté funcionando. Esto tiene una ventaja añadida en, por ejemplo, un laboratorio químico y el instrumento se convierte en una caja negra y solamente la química que entra en el tubo es de interés.

[0053] En un sistema de SPR portátil que se utiliza como una sonda de inmersión, una manera de conseguir esto sería conectar el agarre con un sistema de celda de flujo con tubo y cámara. El tubo puede insertarse en el recipiente y se puede incorporar algún tipo de sistema de bombeo. Sin embargo, en el campo se desea minimizar los componentes, las necesidades de alimentación eléctrica y el tiempo para programar un experimento. Un sistema de todo en uno es altamente deseable - un dispositivo monolítico que arrastra un fluido, libera la muestra sobre la superficie sensible y realiza la medición, todo en un tamaño miniaturizado.

[0054] Una alternativa se representa en la FIGURA 10 que muestra un «cono nariz» o elemento tapa 502 deslizada sobre un prisma sensor 504 con un índice de refracción R1. El elemento tapa 502 contiene como mínimo una vía para microfluidos 506 configurada para suministrar líquido a la parte superior de una superficie metálica de película delgada

508 con el índice de refracción R2. La tapa 502 puede ser una parte plástica fabricada utilizando medios convencionales con pequeñas perforaciones capilares y podría ser una parte desecharable descartada después de la medición. El elemento de la tapa 502 puede configurarse para encapsular el sistema de SPR portátil completo (no se muestra) o una buena parte del mismo, tal como se muestra en la FIGURA 10 en un espacio hermético al líquido como mínimo sobre el prisma sensor 504 de tal modo que ningún líquido pueda penetrar la carcasa 510 del instrumento. La vía para microfluidos 506 es una perforación capilar que suministra la solución de ensayo (con el índice de refracción R2) a una cámara pequeña 512 ubicada en o sobre la línea centrada sobre la superficie metálica de la película delgada 508. La longitud de la perforación capilar puede establecerse según las fuerzas de superficie en acción en el sistema a detectar. La longitud del tubo puede modularse alterando las propiedades de superficie de la pared interior del capilar, por ejemplo, recubriendo la pared interior con agentes activos de superficie, tales como polímeros y tensioactivos, y/o estimulación externa, que incluyen, pero no se limita a, voltaje eléctrico, radiación electromagnética (por ejemplo, luz) y ondas acústicas, de tal modo que el tubo es suficientemente largo para la recogida de muestra y suficientemente corta de tal modo que la muestra alcanza la superficie del sensor. Como resultado, el equipo puede diseñarse para satisfacer cualquier situación especial que pueda aparecer. En una realización particular, se puede idear una tapa con longitud capilar más larga recubriendo la pared interior con un material que incrementaría el ángulo de contacto con la muestra a recoger y convertiría la recogida de muestras de difícil para alcanzar áreas a más fácil. Por supuesto, habría que escoger los materiales de recubrimiento que no interfieran con la detección del analito. Además, el elemento de la tapa 502 incluye una vía microfluídica 514 para ventilar el aire y drenar la solución.

20 [0055] Dado que la SPR depende de la temperatura, se incorporan un sensor de temperatura y un enfriador termoeléctrico 516 (y 122 en FIGURA 2) en la parte inferior del prisma de SPR 504 para proporcionar datos de temperatura a un procesador de señal (por ejemplo, 124 en la FIGURA 2) en tiempo real y compensar el resultado final.

25 [0056] Puede obtenerse una señal de referencia al introducir una solución de referencia sobre la superficie de película delgada metálica utilizando un sistema de dos canales de SPR, mediante lo cual dos sitios sobre la superficie de película delgada metálica se interrogan. Por ejemplo, en el sistema de lentes lenticulares descrito anteriormente, un canal (línea centrada) tendría su propia vía microfluídica para la solución de ensayo con el índice de refracción R3 y otro canal con una vía microfluídica separada para una solución de referencia con el índice de refracción R2. Tal como 30 se representa en la FIGURA 11, la solución de referencia con el índice de refracción R2 puede encontrarse dentro de un elemento de tapa de tipo cono nariz 520 en un vial pequeño que se puede romper 522 y se libera empujando un pistón 524 para romper el vial. La solución se desplaza hacia abajo por una perforación capilar 526 hacia una cámara 528 adyacente a la superficie de película delgada metálica 530 y se aísla de una cámara con solución de ensayo (índice de refracción R3) 532.

35 [0057] Por ejemplo, para muestrear un cuerpo de agua en una ubicación remota, se recoge una muestra en un recipiente de ensayo, se filtra de partículas grandes y el mango de SPR se introduce en el recipiente. La solución se atrae hacia el agujero pequeño por acción capilar y se libera en el sensor. El sistema microfluídico se diseña de tal modo que incluye ventilación, válvulas de autocierre, de tal manera que se puede pasar de un líquido al otro sin 40 introducir burbujas de aire.

Incorporación de Otras Técnicas Analíticas

45 [0058] Tal como se indicó anteriormente, a menudo los laboratorios químicos poseen una multitud de equipamiento adicional que puede producir los mismos resultados utilizando una técnica diferente. En ocasiones los resultados se solapan o un instrumento puede proporcionar información que otros instrumentos no pueden. Cuando se utiliza algún instrumento analítico, es útil tener acceso a otros instrumentos que utilizan tecnología diferente para asegurar la fiabilidad del resultado. Existen muchos instrumentos diferentes que pueden medir concentraciones muy pequeñas. Sin embargo, en ocasiones, es necesario confirmar una medición con otro instrumento o confirmar quer se ha realizado 50 una parte del proceso de un instrumento, tal como se pretendía.

55 [0059] Por ejemplo, en los sistemas de SPR, en los que la superficie del sensor se prepara con un ligando, siendo éste una proteína u otra composición química, tanto si el ligando está unido o no a la superficie, pueden no ser seguro. Sin la unión del ligando a la superficie del sensor, la medición es infructuosa. Como un ejemplo, el ácido borónico (el ligando) se une típicamente a una superficie del sensor de SPR mediante la química de tiol que se utiliza como un sensor de azúcar. El procedimiento de unión del ligando necesita la aplicación de varias sustancias químicas sobre la superficie del sensor durante un periodo de tiempo y la construcción de una monocapa automontable, siendo la última capa el ácido borónico. Aparte de ensayar el ligando con el analito de interés y recibir buenos o confusos resultados, no existe ningún modo de conocer si el ácido borónico se haya adherido realmente al sensor. Un procedimiento para 60 comprobar la unión de ácido borónico a la superficie del sensor es analizar la superficie preparada en otro instrumento analítico, por ejemplo, espectroscopía fotoeléctrica de haces x (XPS) que puede medir la composición elemental de la superficie. Si el ligando se une a la superficie del sensor de SPR, el instrumento mostrará un espectro con una alta concentración de boro en este caso. Teniendo esta información de que el ligando se une de verdad a la superficie del sensor, se descarta cualquier preocupación de que el sensor sea la fuente de resultados imprevistos, y ahorra tiempo 65 experimental que se gastaría en análisis con el sensor que está preparado de manera inapropiada.

[0060] La incorporación de otras técnicas químicas analíticas sería una gran ventaja para un sistema portátil de campo que proporciona datos adicionales o coincidentes para ayudar a la fiabilidad de la medición. Por ejemplo, la espectroscopía de fluorescencia es una técnica común que posee algunas similitudes con SPR en que se puede utilizar la química de ligando/analito. De hecho, el mismo ligando puede utilizarse, sin embargo, en la espectroscopía de fluorescencia, el ligando se disuelve en la solución e interactúa con el analito. Cuando se ilumina con luz de una longitud de onda particular (por ejemplo, Ultravioleta), la solución emite luz fluorescente que emite otras longitudes de onda normalmente en un espectro amplio. Filtrando el espectro y examinando las intensidades de, por ejemplo, la luz azul y verde, se calcula típicamente la proporción de intensidades relativas y a partir de ello se puede deducir la concentración del analito. La diferencia entre espectroscopía de fluorescencia y la espectroscopía de SPR es que la fluorescencia se realiza en solución, mientras que la SPR se realiza sobre una superficie, siendo la SPR intrínsecamente más sensible.

[0061] El hecho que la espectroscopía de SPR y de fluorescencia tienen en común la técnica de química de ligando/analito, lleva a un instrumento de combinación con las dos, SPR y fluorescencia. En la SPR, la superficie del sensor se ilumina desde la parte trasera (la luz pasa a través de un sustrato de vidrio hacia la superficie metálica y se refleja), mientras que en la fluorescencia el sensor se ilumina desde la parte delantera (la luz toca y se refleja desde la superficie metálica y no penetra el sustrato). En un dispositivo portátil, entonces, con una tapa 502 descrita en la Figura 10, esta parte podría extenderse para albergar los elementos de un espectroscopio de fluorescencia, específicamente, una fuente de UV pequeña (por ejemplo, diodo que emite luz, (LED)), filtros de paso de banda para separar el espectro de fluorescencia generado y detectores electrónicos para medir las intensidades relativas de las longitudes de ondas de interés. Dado el estado de la técnica en las fuentes LED que pueden obtenerse en un cuadrado de poco más de 1 mm (por ejemplo, Phillips Lumileds Luxeon p/n LHUV-0385), y con un conjunto de detectores bidimensionales integrantes (por ejemplo, Omnidvision p/n OV07191-A20A, sensor de imagen CMOS 640 x 480) con aproximadamente el mismo tamaño, es posible incorporar en la tapa 502 un espectrómetro de fluorescencia entero que se utiliza conjuntamente con el sistema de SPR que incluye el ligando unido al sensor. La luz reflejada de la señal de fluorescencia podría enviarse también a través de un sistema de espejos hacia el conjunto bidimensional utilizado en el sistema de SPR por razones económicas. En este caso, tienen lugar dos mediciones distintas en la misma muestra 1) el ligando interactúa con el analito en la solución que se encuentra en la parte superior de la superficie metálica y la solución emite luz fluorescente cuando se irradia con luz UV y 2) el ligando y el analito interactúan sobre la superficie metálica causando cambios en el ángulo de resonancia de SPR.

[0062] Este sistema dual resulta muy potente dado que las mediciones pueden realizarse con dos técnicas diferentes casi exactamente al mismo tiempo. Las ventajas obvias incluyen preparación de muestra única, preparación de sensores y resultados más comparables, debido a que cualquier variable que llevaría a mediciones inconsistentes (por ejemplo, temperatura) se tomaría en consideración en exactamente el mismo tiempo. También se puede dar otras ventajas que no son inmediatamente evidentes.

[0063] Otros instrumentos analíticos pueden incorporarse en el dispositivo de SPR portátil y no limitarse a fluorescencia. Por ejemplo, otras técnicas de espectroscopía, en las que una fuente óptica de banda ancha se suministra sobre la superficie y la luz reflejada se mide en función de la longitud de onda; determinadas longitudes de ondas se absorben por la muestra de superficie, que son indicativas de la composición. La fuente de radiación puede ser ultravioleta, visible o infrarroja, en cuyo caso la técnica se conocería como espectroscopía UV-VIS o espectroscopía IR. En una modificación de la configuración de espectroscopía UV-VIS o IR, se puede llevar a cabo Espectroscopía de Reflectancia, en la que la luz se dispersa desde la superficie por el tamaño de partícula. Se podría realizar electroquímica además de la SPR. La electroquímica incluye Espectroscopía de Impedancia y Voltámetro. La electroquímica requiere también una película delgada de metal y se realizaría desde la «parte frontal» de la superficie del sensor, mientras que la SPR interrogaría la muestra desde la «parte trasera» permitiendo mediciones simultáneas tanto de la SPR como la Espectroscopía de Impedancia, por ejemplo.

[0064] La FIGURA 12 muestra los componentes en miniatura en un dispositivo de combinación que utiliza una superficie del sensor con una pareja de ligando y analito que se encuentra en la parte superior de la película de oro. La medición de SPR se lleva a cabo tal como se describe anteriormente, donde el haz de entrada convergente 601 se desplaza a través de un sustrato óptico 602 con un índice de refracción R1 y se enfoca en una imagen lineal en la ubicación de la muestra a prueba 603 que contiene la pareja de ligando y analito. La luz se refleja desde la película de oro 604 y se produce la SPR(0) con ángulo de resonancia 605. La parte de espectrómetro de fluorescencia comprende un LED UV 606 que emite una banda estrecha de luz ultravioleta que se dirige hacia una muestra 603 con un índice de refracción R2, pero desde la cara opuesta de la película de oro como la medición de SPR. El haz UV interactúa con la muestra que contiene la pareja ligando/analito. El haz reflejado transporta la excitación de UV y un espectro de fluorescencia de banda ancha 607. El haz pasa a través de un filtro de doble paso de banda que transmite una luz azul de banda estrecha y una luz verde de banda estrecha, a la vez que bloquea el haz de excitación de UV 608. Una cuña óptica 609 dispersa la luz verde y azul en ángulos diferentes golpeando cada una las mitades respectivas del detector CMOS 610. Los valores de intensidad de cada cara del detector CMOS se registran y los cálculos ratiométricos extraen la concentración.

[0065] Ambos sistemas mostrados en la FIGURA 13 se incorporan en una tapa similar a 502 (véase, la FIGURA 10), 701 con una perforación capilar 702 y una muestra que contiene una pareja de ligando/analito 705. El sistema de

ES 2 923 051 T3

fluorescencia se muestra con LED UV 703 con un brazo de detección 704 que contiene un filtro de paso de doble banda, cuña óptica y detector CMOS. La parte de SPR se muestra con un haz de entrada 707 que se refleja desde la película de oro 709 sobre un sustrato óptico 706 con un índice de refracción R1 que genera un haz de señal de SPR 708. Se muestra el prisma de SPR con facetas 708.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección que comprende:
 proporcionar un dispositivo de resonancia plasmónica de superficie, SPR;
 5 unir un sensor modular reemplazable que comprende una primera capa metálica plana (410) al dispositivo SPR, en el que el dispositivo SPR comprende:
 una carcasa;
 un conjunto de detectores (420);
 un prisma sensor (406) que comprende:
 10 una cara de entrada de doble faceta y una cara de salida de doble faceta, en las que cada faceta de la cara de entrada está inclinada para reflejar internamente un haz de entrada respectivo a una primera cara de la primera capa metálica plana;
 y en el que cada faceta de la cara de salida está inclinada para reflejar internamente un haz de salida respectivo desde una segunda cara de la primera capa metálica plana al conjunto de detectores para proporcionar señales de haz reflejado de salida;
 15 comprendiendo además el procedimiento:
 disponer secuencialmente un fluido de referencia y un fluido de prueba en contacto con la primera capa metálica plana (410);
 20 proporcionar un primer haz de entrada y un segundo haz de entrada a la primera capa metálica (410), respectivamente, a través de las facetas de entrada (402, 404);
 suministrar al conjunto de detectores (420):
 dos señales de haz reflejado cuando la cara superior de la capa metálica está en contacto con el fluido de referencia (422) y dos señales de haz reflejado cuando la cara superior de la capa metálica está en contacto con el fluido de prueba (424);
 25 y procesar dichas señales de haz reflejado para medir una separación, en el conjunto de detectores (420), entre una señal SPR de referencia (422) y una señal SPR de prueba (424).
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende:
 30 extraer la parte del sensor modular reemplazable de la carcasa; y
 unir una parte del sensor modular reemplazable diferente a la carcasa, en el que la parte del sensor modular reemplazable diferente incluye una segunda capa metálica plana.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 35 el sustrato óptico comprende:
 un prisma sensor que comprende:
 una primera faceta de entrada (402) configurada para dirigir el primer haz de entrada en un primer ángulo de incidencia hacia la parte inferior de la primera capa metálica plana (410);
 una segunda faceta de entrada (404) configurada para dirigir el segundo haz de entrada en un segundo ángulo de incidencia hacia la parte inferior de la primera capa metálica plana (410);
 40 una primera faceta de salida (416) configurada para dirigir la señal SPR de referencia para el fluido de referencia al conjunto de detectores (420); y
 una segunda faceta de salida (418) configurada para dirigir la señal SPR de prueba para el fluido de prueba al conjunto de detectores (420).
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluido de prueba comprende un constituyente químico o biológico objetivo.
 45
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el espaciado es un espaciado de píxeles, comprendiendo el procedimiento además:
 50 comparar el espaciado de píxeles, en el conjunto de detectores, entre la señal SPR de referencia para el fluido de referencia y la señal SPR de prueba para el fluido de prueba, con una tabla de calibración para determinar la concentración de una muestra.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que:
 55 el prisma sensor es un sustrato óptico con índice de refracción de R1;
 el fluido de referencia tiene un índice de refracción de R2; y
 el fluido de prueba tiene un índice de refracción de R3.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una dispersión angular efectiva del haz incidente es suficiente para capturar la señal del fluido SPR de referencia y la señal del fluido SPR de prueba.
 60
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que el fluido de referencia es aire.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el intervalo angular es de al menos aproximadamente 28 grados.
 65

10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el haz incidente comprende luz de múltiples longitudes de onda.

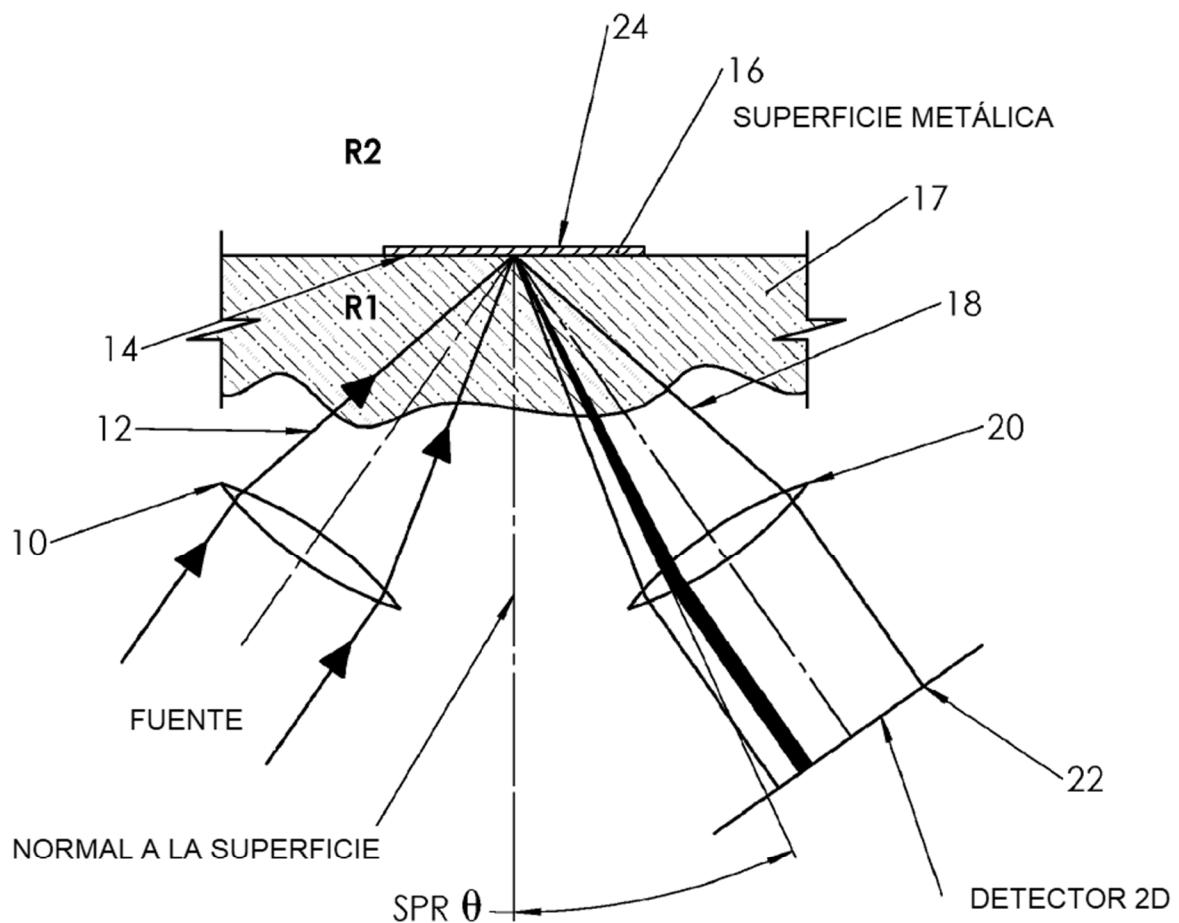
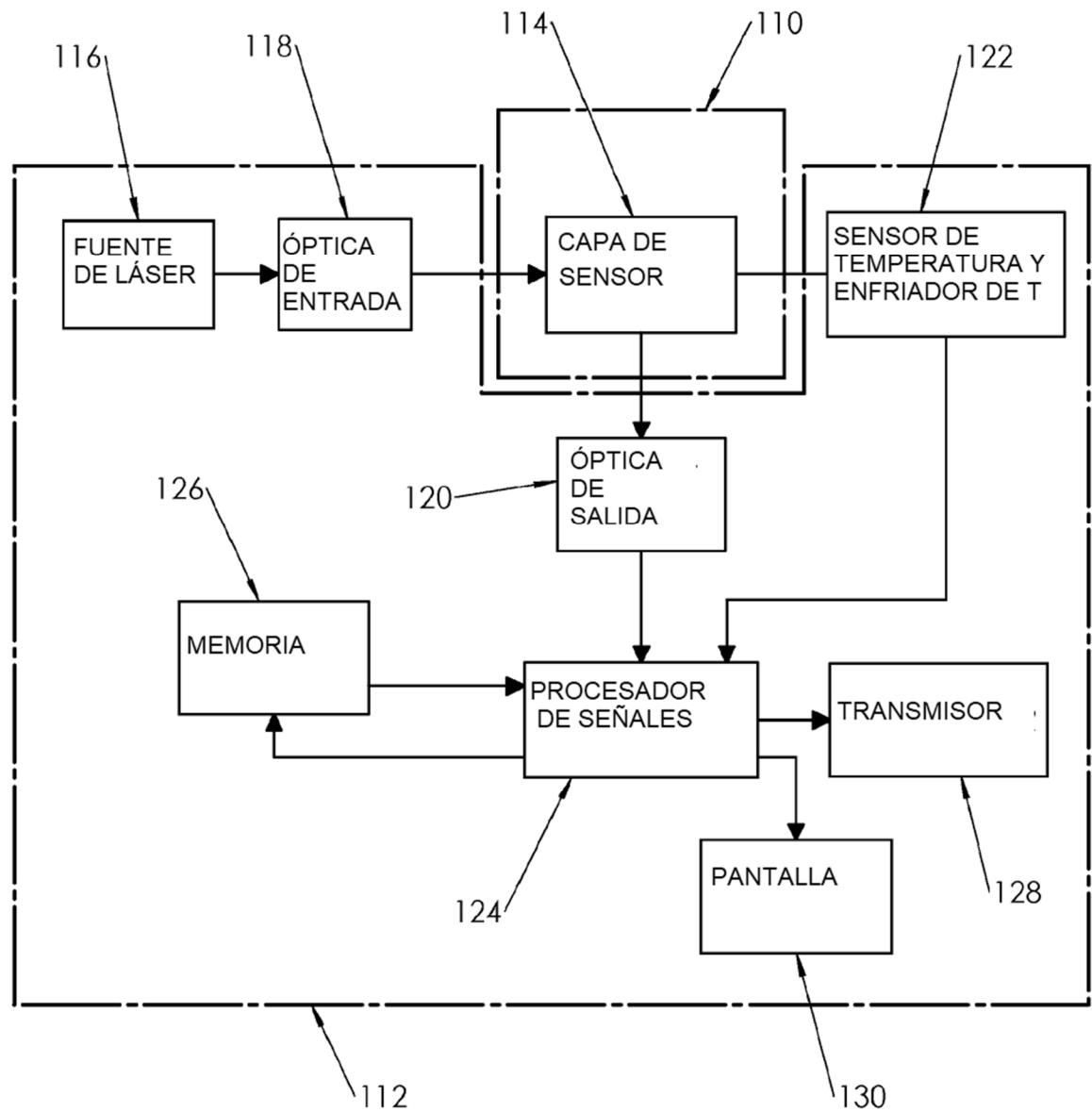


FIG 1

**FIG 2A**

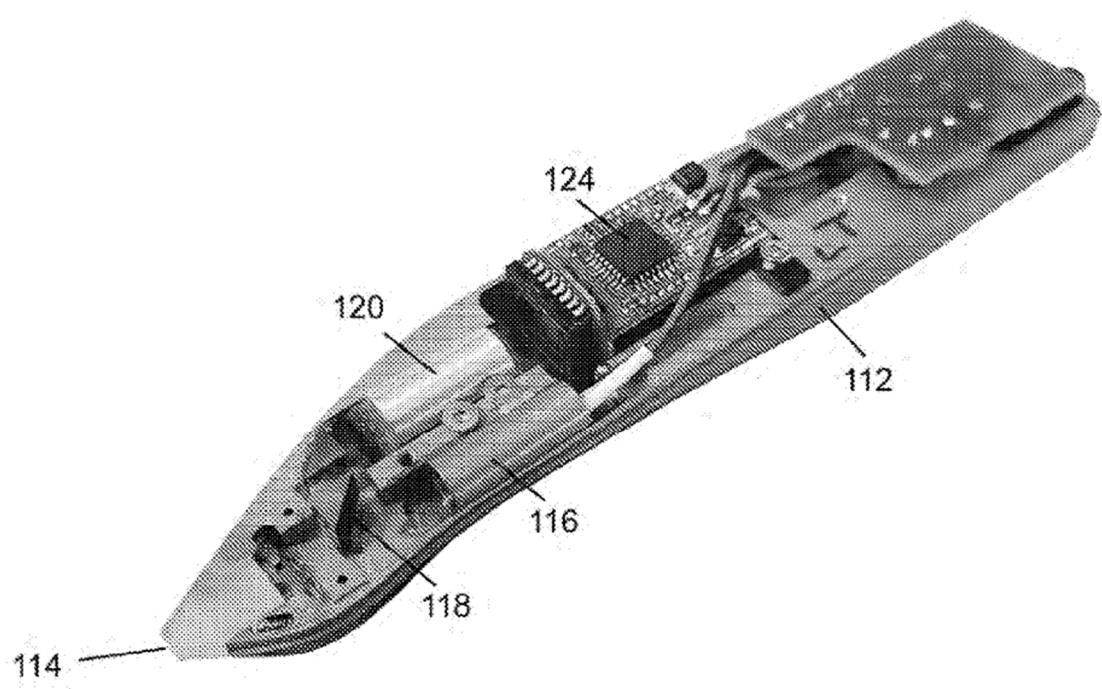


FIG 2B

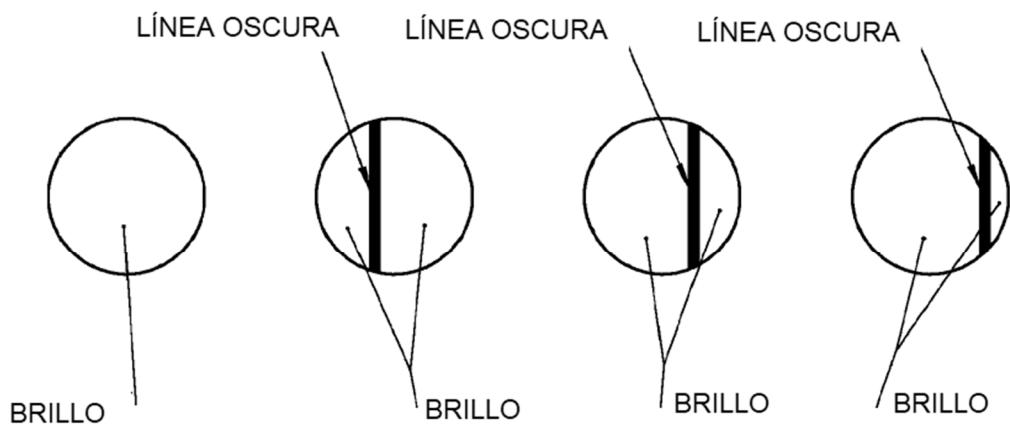
IMAGEN OBTENIDA EN EL DETECTOR

SIN SEÑAL

SEÑAL DE AGUA

AGUA SALADA

ETANOL



MOVIMIENTO DE SEÑAL CON ÍNDICE DE REFRACCIÓN CRECIENTE DE SOLUCIÓN

FIG 3

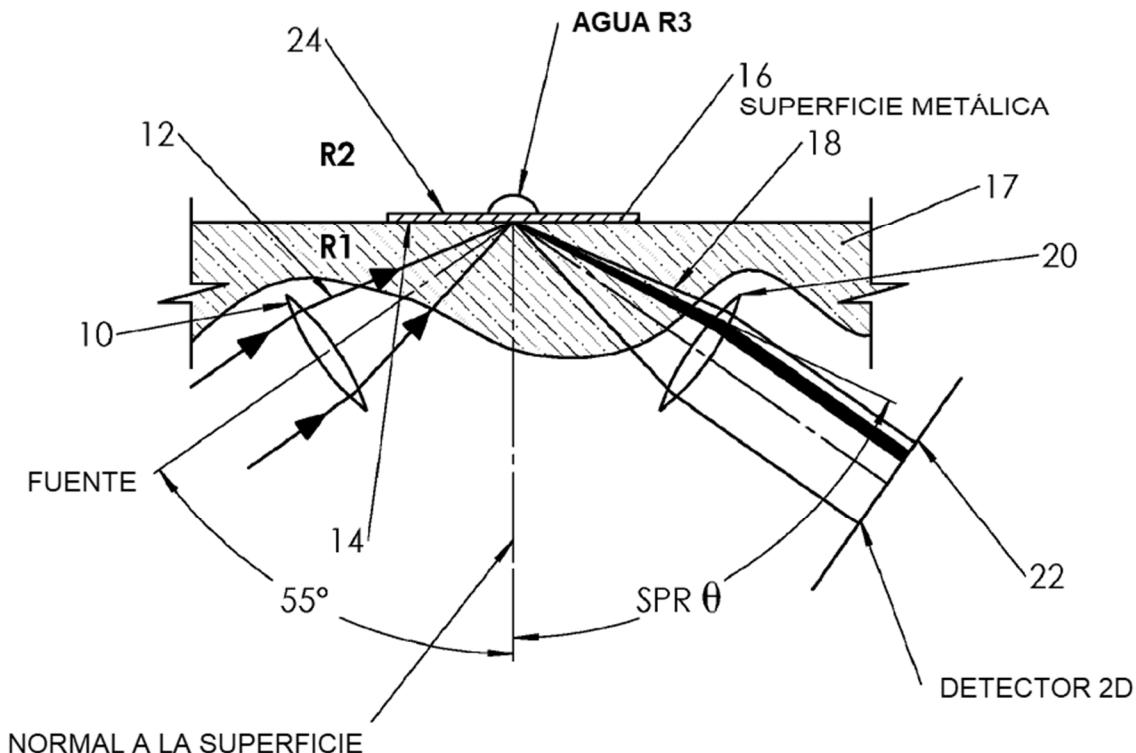


FIG 4A

IMAGEN OBTENIDA EN EL DETECTOR

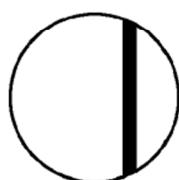


FIG 4B

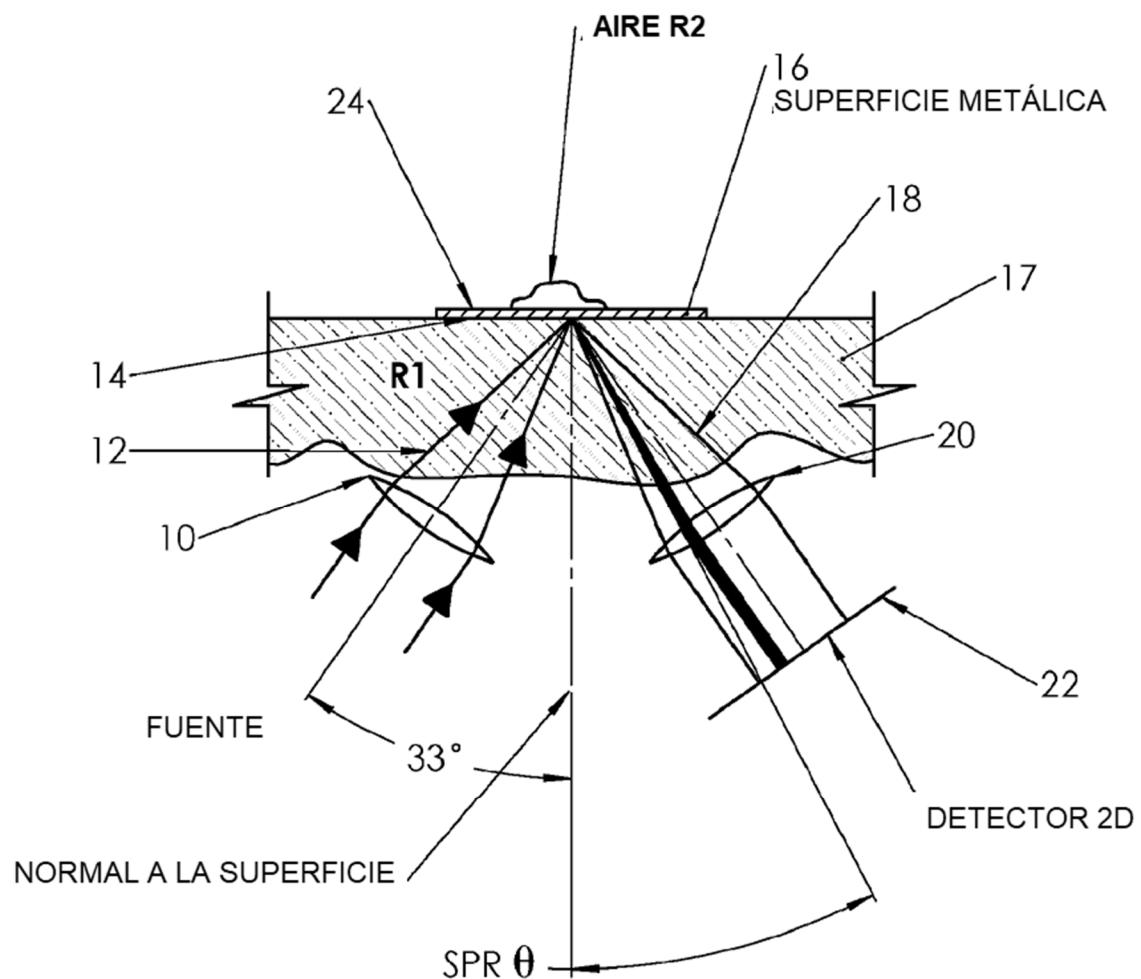


FIG 5A

IMAGEN OBTENIDA EN EL DETECTOR

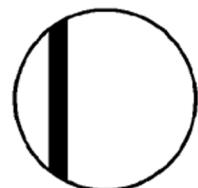


FIG 5B

LENTE MULTIELEMENTOS Y DOS DETECTORES 300

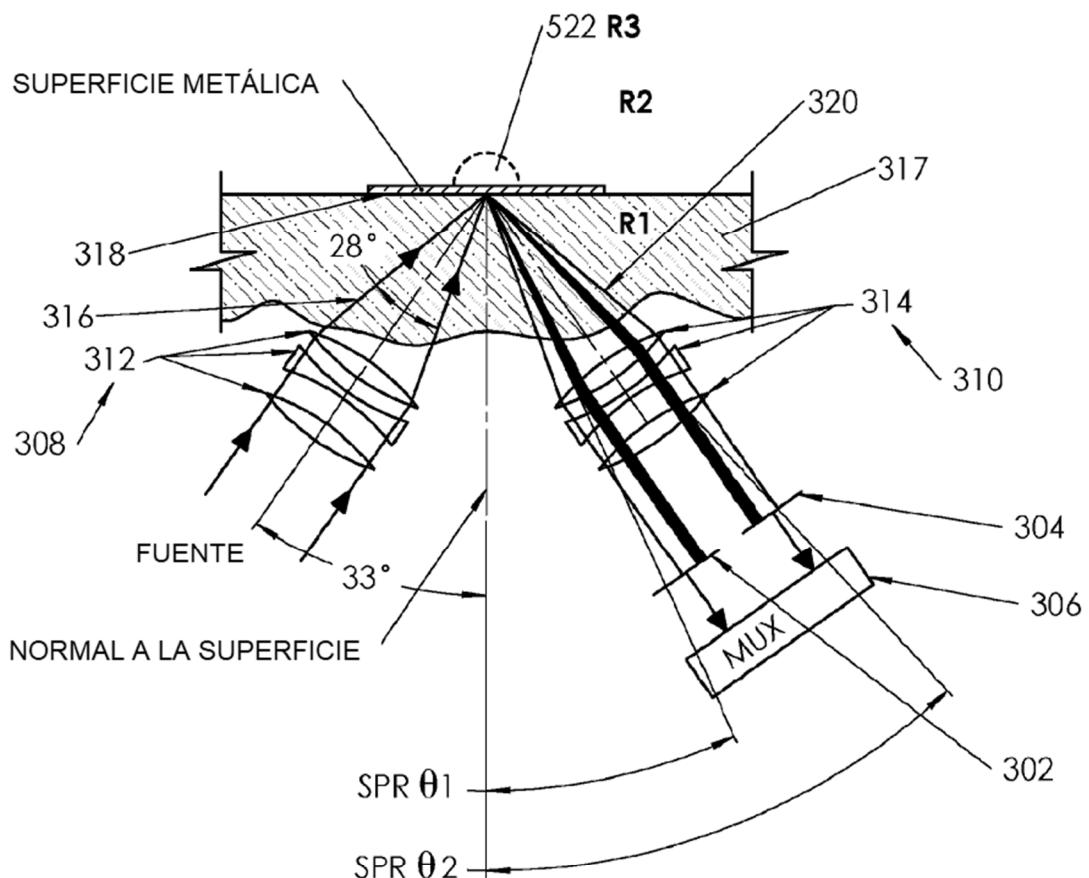
**FIG 6A**

IMAGEN OBTENIDA EN EL DETECTOR

**FIG 6B**

LENTE MULTIELEMENTOS, COMBINADOR DE HACES Y UN DETECTOR 350

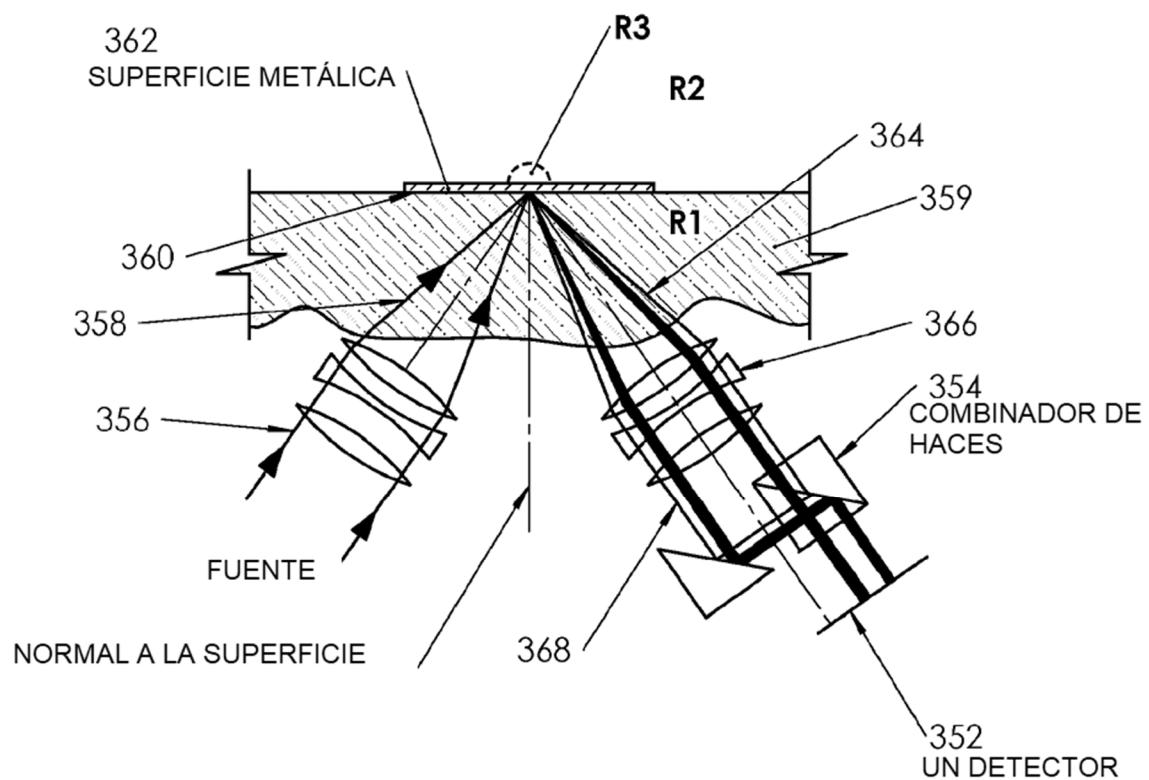


FIG 7A

IMAGEN OBTENIDA EN EL DETECTOR



FIG 7B

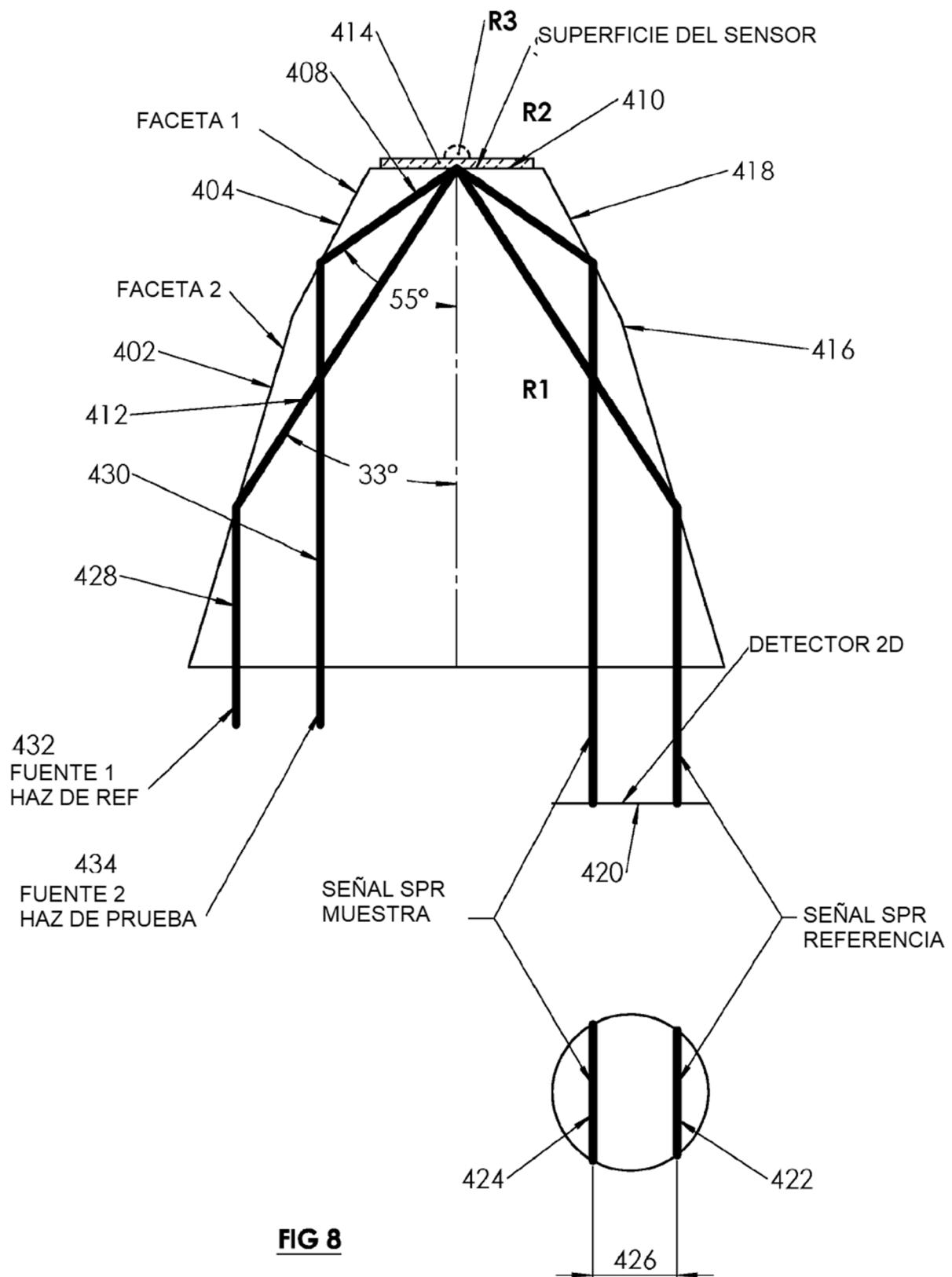


FIG 8

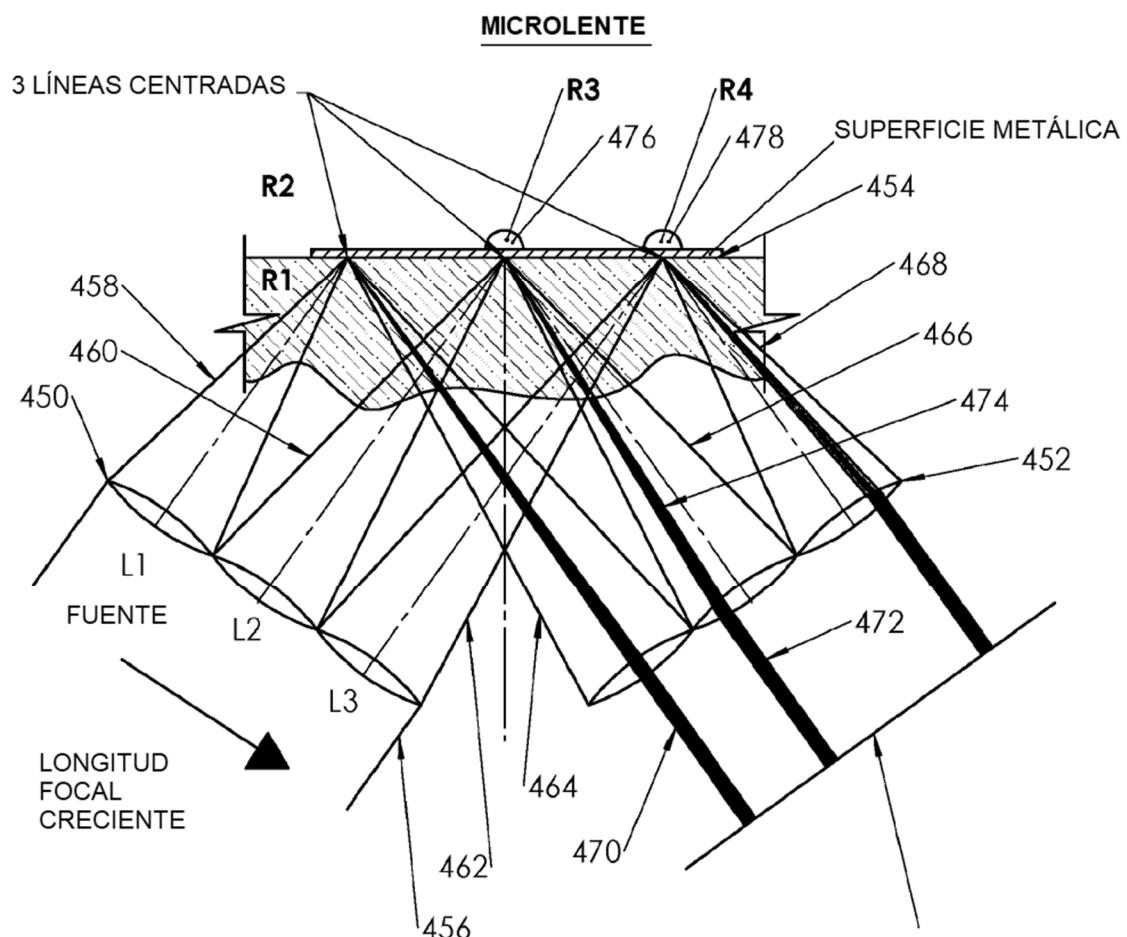


FIG 9A

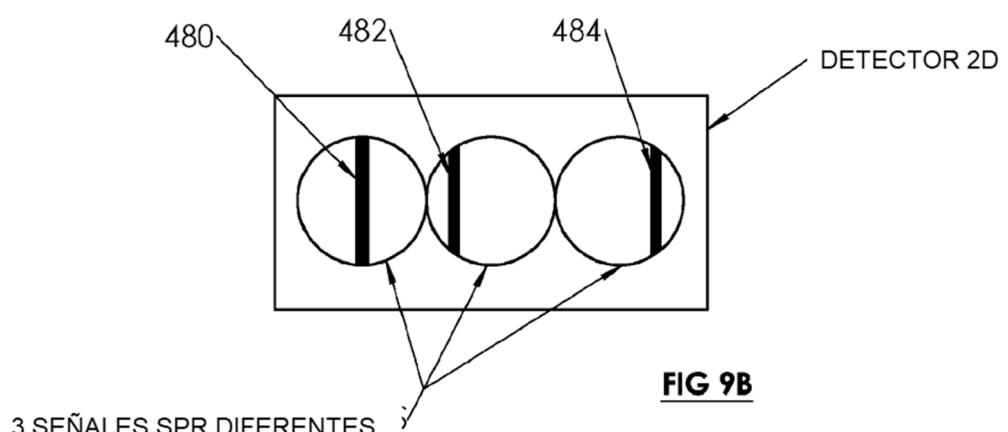
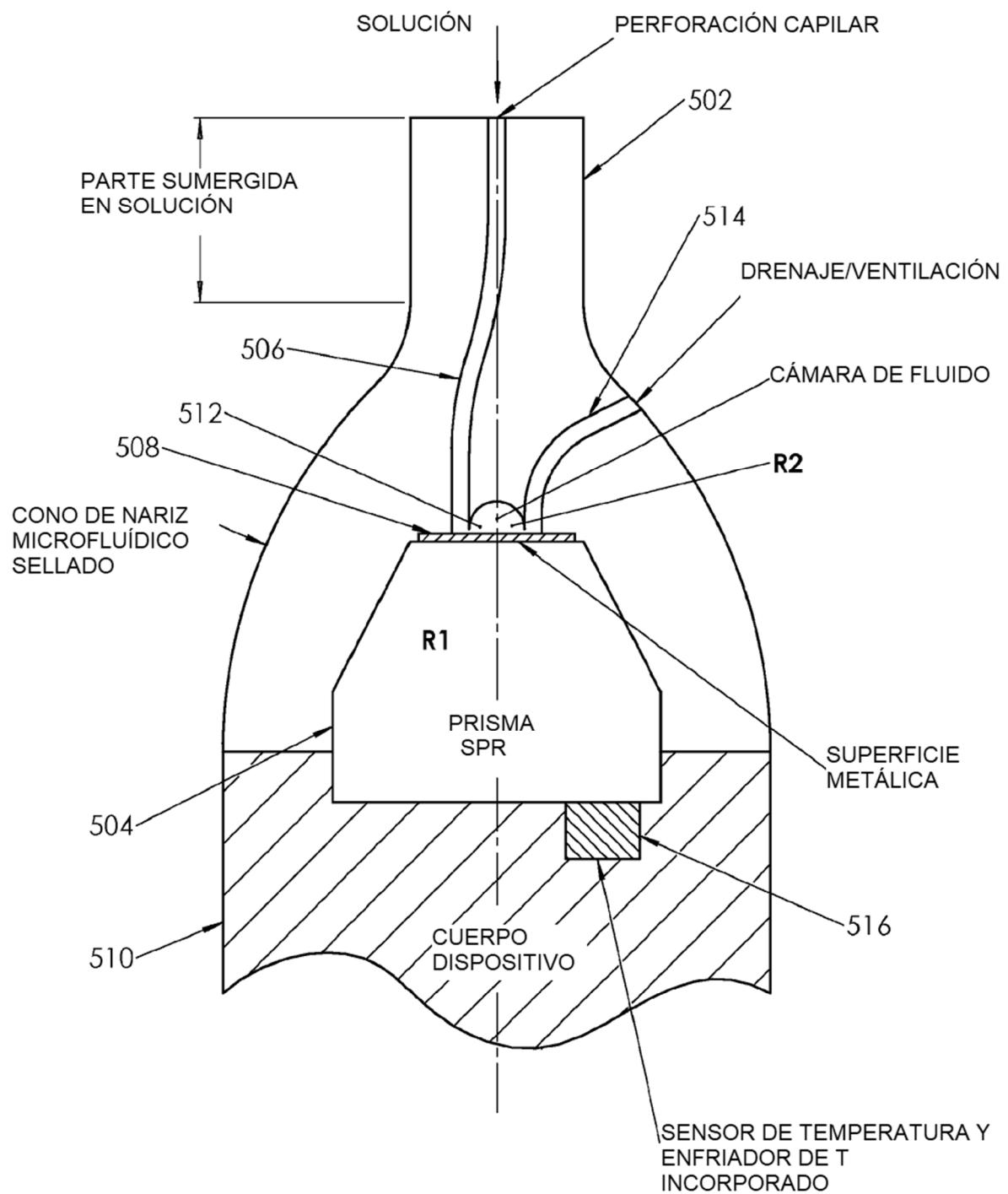
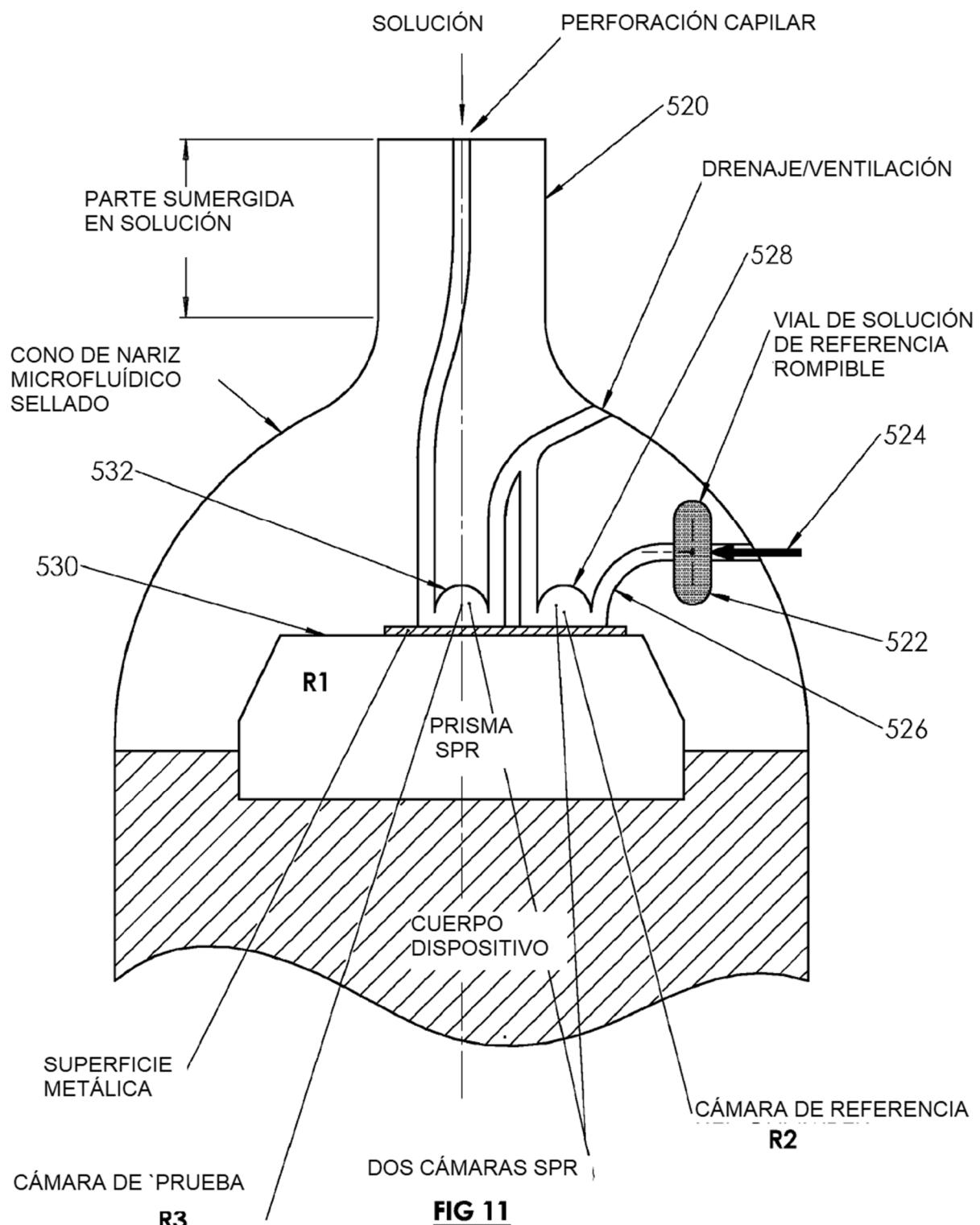
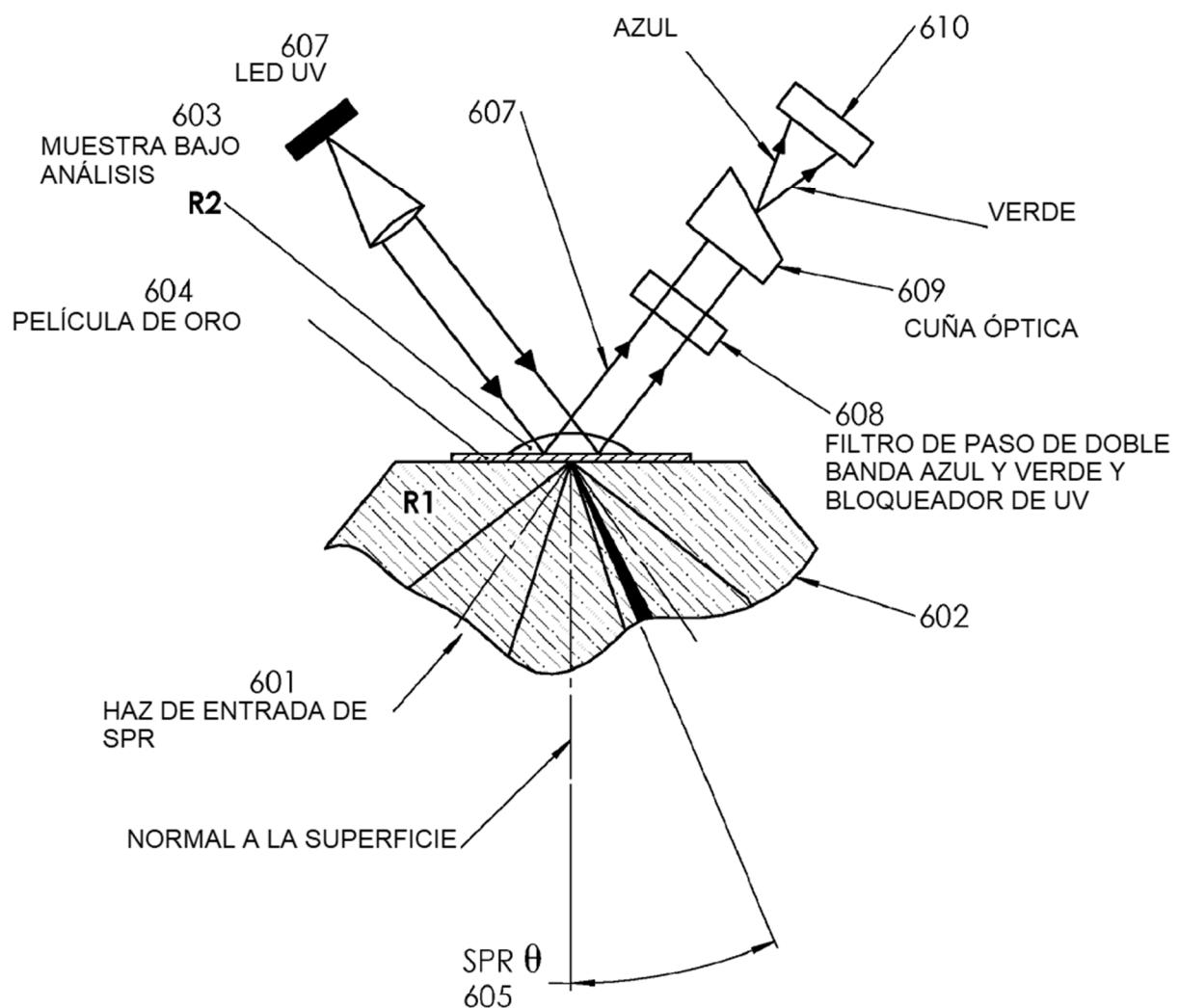


FIG 9B

**FIG 10**

**FIG 11**

**FIG 12**

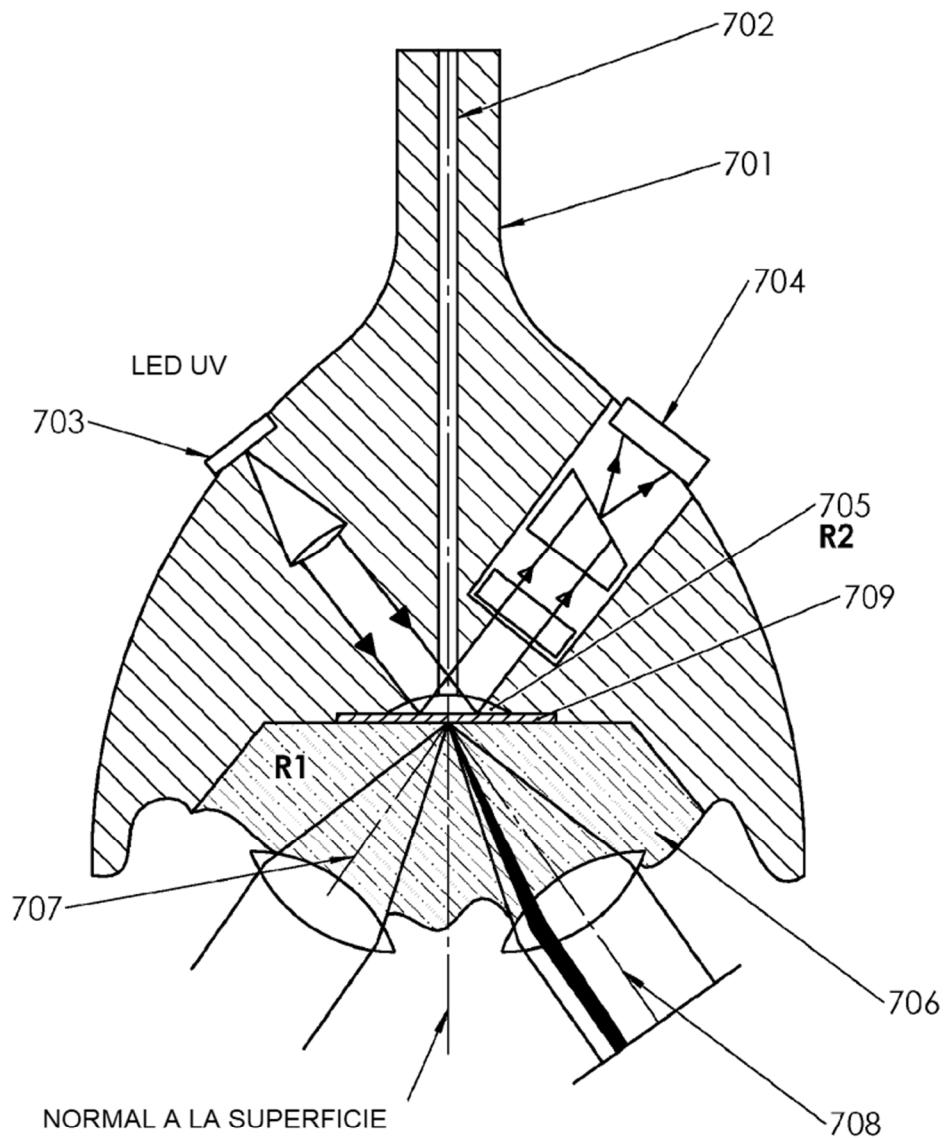


FIG 13