

(11) Número de Publicação: **PT 1204858 E**

(51) Classificação Internacional:  
**G01N 21/69** (2007.10)

---

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2000.08.16**

(30) Prioridade(s): **1999.08.17 US 376139**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.05.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.07**  
**154/2008**

(73) Titular(es):

**ORION DIAGNOSTICA OY**  
**KOIVU-MANKKAAN TIE 6 B 02200 ESPOO FI**

(72) Inventor(es):

**TIMO ALA-KLEME FI**  
**KEIJO HAAPAKKA FI**  
**PENTTI JUHALA FI**  
**JOUKO KANKARE FI**  
**SAKARI KULMALA FI**

(74) Mandatário:

**JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO**  
**R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A MEDAÇÃO DA LUMINESCÊNCIA**

(57) Resumo:

### Resumo

#### "Processo para a medição da luminescência"

Processo para determinar a concentração de um composto emissor de luz. Um impulso eléctrico é aplicado a um par de eléctrodos fornecedores de corrente imersos num electrólito que apresenta posicionado entre os eléctrodos um condutor que não se encontra em contacto electrónico com os eléctrodos. Como resultado do impulso eléctrico aplicado, o composto emissor de luz em contacto electrónico com o condutor produz luminescência em que a luz emitida é medida e utilizada para quantificar o composto emissor de luz.

## Descrição

### "Processo para a medição da luminescência"

#### Campo da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para analisar a concentração de um composto emissor de luz através da luminescência e, mais particularmente, a um processo para analisar a concentração de um composto emissor de luz através de luminescência química gerada electricamente.

#### Antecedentes da invenção

Existe uma necessidade cada vez maior de processos específicos, sensíveis, rápidos e económicos de detectar e quantificar substâncias químicas, biológicas e bioquímicas tais como anticorpos, hormonas, vírus, enzimas, metabolitos, narcóticos, venenos, drogas, microrganismos e ácidos nucleicos. A sensibilidade necessária e especificidade são obtidas utilizando reacções de ligação, por exemplo, reacções de anticorpos antígenos em que a presença de complexo de valor diagnóstico, isto é, analito, é indicado por meio de uma etiqueta detectável fixada a um ou mais dos materiais complexos. Exemplos de compostos de etiquetagem comercialmente úteis são aqueles passíveis de gerar uma luminescência com base em processos fotoquímicos, químicos ou excitação electroquímica.

Os processos analíticos com base na luminescência e nas suas várias modificações são geralmente conhecidos pela sua sensibilidade, mas cada um apresenta as suas próprias desvantagens a concentrações muito baixas das espécies

emissoras. A sensibilidade da fluorescência é limitada pelo fenómeno de difusão Raleigh e Raman assim como impurezas fluorescentes que aumentam a emissão de fundo não específica. A fosforescência é principalmente restringida ao estado sólido e a emissão daqueles muito poucos compostos que apresentam fosforescência à temperatura ambiente na solução é geralmente extremamente sensível ao oxigénio, que dificulta as suas aplicações práticas. Os processos baseados na fluorescência e fosforescência convencional utilizam uma excitação por luz e necessitam de uma fonte de luz e óptica apropriadas. Os processos com base na luminescência química não necessitam de óptica de excitação e a instrumentação é geralmente muito simples. Contudo, os processos de luminescência química são frequentemente sujeitos a sérias interferências químicas. O processo com base numa excitação electroquímica instrumentalmente simples (isto é luminescência química gerada electricamente ou *ECL*) utiliza uma excitação por um impulso eléctrico aplicado num eléctrodo que proporciona um limite de detecção baixo.

O *ECL* de compostos inorgânicos e orgânicos em soluções electrolíticas é bem conhecido na técnica. Por exemplo, o *ECL* anódico de luminol no eléctrodo de platina num electrólito aquoso é estudado desde 1929 (por exemplo N. Harvey, J. Phys. Chem. 33 (1929); K. Haapakka e J. Kankare, Anal. Chim. Acta 138 (1982) 263), *ECL* de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na presença de oxalato num electrólito aquoso e uma *ECL* catódica de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na presença de peroxidisulfato e uma mistura de acetonitrilo/água foram documentados por Bard et al. (D. Ege,

W. Becker e A. Bard, Anal. Chem. 56 (1984), um ECL catódico de vários iões inorgânicos (K. Haapakka, J. Kankare e S. Kulmala, Anal. Chim. Acta 171 (1985) 259) e vários compostos orgânicos (K. Haapakka, J. Kankare e O. Puhakka, Anal. Chim. Acta 207 (1988) 195) num eléctrodo de alumínio coberto com óxidos em electrólitos aquosos que contêm um agente oxidante apropriado, em que o ECL de vida curta é medido durante o impulso eléctrico aplicado aos eléctrodos. Uma variedade de complexos térbio (III) é passível de iniciar um ECL catódico específico de térbio (III) de vida longa num eléctrodo de alumínio coberto de óxido num electrólito aquoso que contém peroxidisulfato, que torna possível eliminar o ECL de fundo de vida curta utilizando uma detecção ECL de resolução temporal criando deste modo a base para análise de traço extremo (J. Kankare, K. Fäldén, S. Kulmala e K. Haapakka, Anal. Chim. Acta 256 (1992) 17; J. Kankare, A. Karppi e H. Takalo, Anal. Chim. Acta 295 (1994) 27). Foi proposta a análise da ligação dos analitos de interesse com base na medição de ECL na superfície do eléctrodo: por exemplo, A. Bard et al. (D. Ege, W. Becker e A. Bard, Anal. Chem. 56 (1984) 2413 e WO 86/02734) propuseram etiquetas de ECL que contêm ruténio (III) - e ósmio (III) -; , J. Kankare e K. Haapakka (GP 2217007 B, US 5.308.754), J. Kankare, K. Haapakka, S. Kulmala, V. Näntö, J. Eskola e H. Takalo, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 205 e M. Billadeau et al. (WO 96/41177) sugeriram a utilização de etiquetas de ECL que contêm Ln (III) (Ln(III) = Dy(III), Eu(III), Sm(III), Tb(III)) nas análises de ligação com base numa ECL de resolução temporal.

Foram propostas várias configurações da célula de amostra e processos de medição para a detecção de *ECL* em que a *ECL* é gerada na superfície do eléctrodo (por exemplo na EP 65 8760 A1 e da WO 96/28538) ou na superfície dos leitos magnéticos recolhidos na superfície do eléctrodo (por exemplo na WO 92/14139; WO 92/14138, JP 08190801 A2 e WO 96/15440). Os detectores de *ECL* foram aplicados em cromatografia líquida de alta pressão (por exemplo D. Skotty, W. Lee e T. Nieman, Anal. Chem. 68 (1996) 1530) e em electroforese capilar (por exemplo G. Forbes, T. Nieman e J. Sweedler, Anal. Chim. Acta 347 (1997) 289).

Jones (EP 962 773) estudou conhecidas reacções *ECL* em eléctrodos bipolares. Na referida publicação a reacção electroquímica tem lugar em partículas de carbono condutoras muito pequenas, sendo que são necessários por conseguinte gradientes de alta tensão, que não são realísticos na prática, para obter uma queda de tensão suficiente através das partículas de carbono condutoras. Jones não descreve condutores combinados de materiais electroquimicamente inertes e metais isolados ou semimetais ou as suas misturas, que proporcionam um dos aspectos únicos da presente invenção, contribuindo para a permissão da análise de vários componentes e normalização interna, tal como se apresenta a seguir. Na análise de vários componentes, que é uma das formas de realização preferidas da presente invenção, é também necessário um tampão para cada etiqueta e para cada material condutor tal como apresentado a seguir.

Tipicamente para *ECL*, o composto luminescente tem que estar na proximidade próxima da superfície do eléctrodo. Especialmente tal como para as análises imunológicas *ECL*, a etiqueta *ECL* que contém composto luminescente fixado ao anticorpo ou antígeno, encontra-se ligada à superfície do eléctrodo, por exemplo pela imunoreacção directa em que um dos imunoreagentes se encontra immobilizado na superfície do eléctrodo (J. Kankare e K. Haapakka, GB 2217007 B, US 5.308.754), ou indirectamente utilizando leitos magnéticos não condutores revestidos com imunoreagentes, que após a imunoreacção ter ocorrido, são acolhidos na superfície do eléctrodo por um campo magnético. A vantagem de utilizar estes leitos magnéticos é uma reacção de ligação consideravelmente mais eficiente se comparada com aquela, por exemplo, na superfície do eléctrodo plana revestida com anticorpos. Contudo, a utilização de leitos magnéticos em análises *ECL* não se encontra livre de desvantagens: (i) a eficiência de excitação é frequentemente baixa devido a ser necessária uma distância de excitação de cerca de 25 Å ou menos da superfície do eléctrodo (veja, por exemplo WO 92/14139): (ii) a eficiência de detecção da luz emitida da proximidade da superfície do eléctrodo é impedida pela camada do leito que protege da luz e (iii) os leitos magnéticos desligam-se da superfície do eléctrodo durante um impulso de excitação curto inibindo deste modo a eficiência de excitação.

Embora os leitos magnéticos proporcionem um melhoramento em relação aos processos *ECL* convencionais, existe ainda uma

necessidade na técnica, de análises ECL que exibam uma sensibilidade adicionalmente aumentada e permitam a análise de vários componentes e/ou normalização interna. Sendo assim, é um objectivo da presente invenção proporcionar um processo ECL que apresente uma sensibilidade acentuada e, vantajosamente, a capacidade de analisar a concentração de vários analitos de interesse.

#### Sumário da invenção

A presente invenção proporciona um processo para medir a concentração de um composto luminescente com sensibilidade melhorada. O processo inclui proporcionar um electrólito que apresenta imerso dentro do mesmo um par de eléctrodos que fornecem corrente com material condutor eléctrico posicionado entre os eléctrodos, mas não em contacto electrónico com os eléctrodos, e um composto luminescente. É depois aplicada uma corrente eléctrica aos eléctrodos para induzir o composto luminescente em contacto electrónico com o material condutor eléctrico para produzir luminescência. A luminescência (isto é luz emitida) é medida para obter a concentração do composto luminescente.

Os exemplos dos materiais condutores eléctricos compreendem, mas não se encontram limitados a, materiais electroquimicamente inertes e metais isolados, ligas ou semimetais ou combinações dos mesmos. Os materiais electroquimicamente inertes representativos são carbono vítreo, ouro, platina, ou misturas dos mesmos. Os metais isolados representativos ou semimetais são o alumínio, hâfnio, magnésio, silício, tântalo, titânio, zircónio ou

misturas dos mesmos. De preferência, o material isolador é um óxido ou revestimento polímero. Numa forma de realização o material condutor eléctrico é uma membrana porosa coberta com uma camada fina do material electroquimicamente inerte ou material isolado ou semimetal.

O electrólito é um electrólito não aquoso ou aquoso. O composto luminescente encontra-se fixado à superfície do material condutor eléctrico ou, alternativamente, encontra-se ligado a um analito de interesse (por exemplo um ácido nucleico ou sequência de aminoácido). Numa forma de realização, a luminescência é medida após um atraso do fim de um impulso eléctrico aplicado aos eléctrodos que fornecem a corrente. Em outras formas de realização, a luminescência é induzida utilizando pelo menos dois compostos diferentes electroquímico-luminescentes, pelo menos dois tipos diferentes de materiais condutores eléctricos ou pelo menos dois analitos diferentes de interesse.

Vantajosamente, o processo da presente invenção proporciona uma análise ECL com sensibilidade acentuada. Outras vantagens incluem a capacidade de analisar a concentração de vários analitos de interesse e proporcionar normalização interna. Estas e outras vantagens tornar-se-ão visíveis da seguinte descrição.

#### Breve descrição dos desenhos

Figura 1 diagrama em bloco do dispositivo luminescente gerado electricamente, sem contacto, com um único material condutor eléctrico.

Figura 2 gráfico da luminescência como uma função de concentração de luminol medida por luminescência gerada electricamente sem contacto.

Figura 3 gráfico da luminescência como função da concentração  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  medida por luminescência gerada electricamente sem contacto.

Figura 4 gráfico da luminescência como uma função da concentração de terbio (III) medida por luminescência gerada electricamente sem contacto atrasada.

Figura 5 gráfico da luminescência com uma função da concentração da hormona de estimulação da tireóide humana ( $\text{hTSH}$ ) medida pela luminescência gerada electricamente sem contacto atrasada.

Figura 6 gráfico de  $\text{Tb}(\text{III})$  (●) e concentrações  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  (○) numa mistura da amostra medida por luminescência gerada electricamente sem contacto e sem contacto atrasada, respectivamente.

Figura 7 elétroluminograma do composto de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ilustrando o efeito na luminescência ao variar o diâmetro dos condutores Au esféricos: 2,0 mm (- - -); 2,5 mm (.....); 3,5 mm (----); e 6,0 mm (—).

#### Descrição pormenorizada da invenção

A presente invenção proporciona um processo único para medir a concentração de um composto luminescente com sensibilidade acentuada. Este processo tal como adicionalmente descrito a seguir é na presente referido como uma luminescência gerada electricamente sem contacto ou COEL.

De acordo com a presente invenção, encontra-se proporcionado um electrólito que contém um composto luminescente que apresenta imerso no mesmo um par de eléctrodos que fornecem a corrente. Um material condutor eléctrico encontra-se posicionado entre os eléctrodos que fornecem a corrente, mas não em contacto electrónico com os eléctrodos. O contacto electrónico neste contexto quer dizer tanto o contacto físico como estar dentro da distância de excitação necessária para induzir a luminescência de um composto luminescente, que é de preferência 25 Å ou menos. Uma corrente eléctrica é gerada entre os eléctrodos induzindo o composto luminescente dentro do contacto electrónico de um material condutor eléctrico à luminescência. Deste modo, ao contrário dos processos *ECL* anteriores, a emissão de luz pode ser gerada sem que o composto luminescente esteja em contacto electrónico com os eléctrodos que fornecem a corrente. A luminescência (isto é, a emissão de luz) é medida seguindo técnicas convencionais para obter a concentração do composto luminescentes.

O material condutor eléctrico (na presente referido como "condutor") é qualquer material condutor eléctrico que não reage de modo prejudicial com o electrólito. O condutor deve apresentar uma condutividade igual a, de preferência maior do que, a condutividade do electrólito. Embora não se deseje que esteja ligado pela teoria, crê-se que uma corrente faradaica é gerada através do condutor provocando uma queda de tensão no electrólito quando uma corrente é gerada entre os eléctrodos que fornecem a corrente. Este processo de gerar

uma corrente faradaica é também conhecido como electrólide bipolar tal como mencionado em Eardley, D. Handley e S. Andrew, *Electrochim. Acta* 18(1973)839; F. Goodridge, C. King e A. Wright, *Electrochim. Acta* 22(1977)347; M. Fleischmann, J. Ghoroghchian e S. Pons, *J. Phys. Chem.* 89(1985)5530.

De preferência o condutor é realizado de um material condutor eléctrico utilizado para eléctrodos em análises *ECL*. Por exemplo, o condutor pode ser um material electroquimicamente inerte tal como carbono vítreo, ouro, platina, aço inoxidável ou uma combinação dos mesmos. O condutor pode também ser um material isolado, liga, semimetal ou qualquer combinação dos mesmos. Os exemplos específicos de metais ou semimetais incluem, mas não se encontram limitados a, alumínio, háfnio, magnésio, silício, tântalo, titânio, zircónio, ou qualquer combinação dos mesmos. Neste contexto, isolado quer dizer que o metal, liga ou semimetal se encontra isolado (isto é coberto) com um revestimento protector tal como um óxido ou revestimento polímero. O revestimento pode apresentar entre 1 a 100 nanómetros, tal como com os eléctrodos cobertos com óxido utilizados em análises *ECL* conhecidas.

Tal como será visível aos técnicos, a escolha do material para o condutor depende do tipo de reacção *ECL* utilizada para gerar luminescência. Por exemplo, se uma reacção *ECL* anódica for utilizada para iniciar a luminescência é seleccionado um material electroquimicamente inerte. Por outro lado, se for utilizada uma reacção *ECL*

catódica para iniciar a luminescência é seleccionado um metal isolado, liga ou semimetal.

Os condutores da presente invenção podem também conter componentes não condutores adicionais para alterar as propriedades físicas do condutor. Por exemplo, o condutor pode possuir um núcleo polímero para diminuir a densidade do condutor para permitir que o mesmo seja suspenso no electrólito. Do mesmo modo, o condutor pode possuir um núcleo formado de um metal magnético ou liga para ajudar na recolha do condutor. Os metais magnéticos e ligas conhecidos podem ser utilizados, tal como aqueles apresentados no Handbook of Chemistry e Physics, 70<sup>a</sup> ed., CRC press que é incorporado aqui como referência.

De acordo com a presente invenção, o condutor pode apresentar qualquer forma ou dimensão. Por exemplo, o condutor pode apresentar uma forma esférica ou elíptica. Os materiais condutores eléctricos moldados como esferas encontram-se facilmente disponíveis de fontes comerciais tal como AbbotBall Company localizado em Connecticut, EUA. Os condutores esféricos podem apresentar uma dimensão de 10 µm a 10 mm. Do mesmo modo, o condutor pode ser uma matriz porosa que apresenta na mesma o material electroquimicamente inerte, ou o metal isolado ou semimetal.

Opcionalmente, o electrólito pode conter condutores de diferentes formas, dimensões e materiais condutores eléctricos para proporcionar potenciais limiares alternos para induzir a luminescência. Por exemplo, tal como será visível aos técnicos que seguem os ensinamentos da invenção,

os condutores formados de diferentes materiais, tal como ouro e alumínio, irão apresentar diferentes potenciais limiares para iniciar a luminescência de um composto luminescente (isto é, uma fracção *ECL*) em contacto electrónico com o condutor. Do mesmo modo, os condutores que apresentam diferentes dimensões irão também exibir diferentes potenciais limiares para iniciar a luminescência da fracção *ECL*. Este aspecto único da invenção permite que sejam conduzidas várias reacções *ECL* no mesmo electrólito, o que por sua vez facilita a normalização interna e a análise de vários analitos de interesse.

O electrólito é qualquer electrólito utilizado para reacções *ECL*. De acordo com a presente invenção, o electrólito pode ser um electrólito aquoso ou não aquoso. A escolha do electrólito é parcialmente determinada por factores tais como o analito a ser detectado e a fracção *ECL* a ser utilizada. Por exemplo, se a concentração de biomoléculas (por exemplo ácido nucleico ou proteína) tiver que ser averiguada, é seleccionado um electrólito aquoso tampão. Tais parâmetros podem facilmente ser determinados pelo técnico.

De acordo com a invenção, a fracção *ECL* é qualquer fracção luminescente utilizada para análises *ECL*. Sendo assim, as fracções *ECL* são de preferência quelatos metálicos. Exemplos de quelatos metálicos a serem utilizados incluem, mas não se encontram limitados a, quelatos de transição ou metais de terra rara tais como ruténio, térbio, ósmio, rénio, irídio, ródio, platina, índio, paládio, molibdénio, tecnécio,

cobre, crómio, tungsténio, ou combinações dos mesmos. Dois quelatos especialmente preferidos são o ruténio e quelatos de terbio.

Os eléctrodos de fornecimento de corrente são feitos de quaisquer materiais condutores eléctricos utilizados para eléctrodos nas reacções *ECL*. Sendo assim, os eléctrodos podem ser formados dos mesmos materiais condutores eléctricos utilizados para formar os condutores tal como descrito acima. Numa forma de realização da invenção, os eléctrodos e o condutor são do mesmo material. Numa outra forma de realização, os eléctrodos de fornecimento de corrente são feitos de materiais condutores eléctricos em que não é possível qualquer emissão *ECL* para minimizar a emissão de fundo. De preferência, os eléctrodos encontram-se espaçados distalmente um do outro.

Uma corrente eléctrica é gerada aplicando uma tensão apropriada aos eléctrodos de fornecimento de corrente durante um quadro de tempo predefinido, resultando num fluxo de corrente parcial através do condutor fazendo com que a fracção *ECL* em contacto electrónico com o condutor entre em luminescência. A tensão necessária (isto é, o potencial limite) para induzir a luminescência depende do potencial interfacial da interface electrolítica condutora e do troço da corrente faradaica que flui através da interface. Tal como será visível aos técnicos da electrólise bipolar, a corrente flui através do condutor dependendo dos seguintes factores: (1) a condutividade da solução electrolítica, (2) o material condutor eléctrico utilizado para o condutor, (3) a dimensão

maior do condutor orientada ao longo das linhas de fluxo de corrente, (4) o espaço livre do trajecto da corrente na solução electrolítica em redor do condutor, (5) o carácter do processo do eléctrodo que ocorre na interface, e (6) a resistência interfacial entre o condutor e a solução. Deste modo, a variação dos parâmetros tal como a dimensão, forma, orientação, localização ou material do condutor irá afectar a tensão necessária para ser aplicada aos eléctrodos que fornecem a corrente para induzir a luminescência. Estes parâmetros podem facilmente ser averiguados pelo técnico que segue os ensinamentos da presente invenção.

A intensidade da luz resultante é medida no comprimento de onda e/ou base de resolução temporal durante um período necessário para alcançar o rácio necessário de sinal para ruído, e utilizado para a quantificação do composto luminescente. O detector de luz é qualquer dispositivo detector de luz, tal como um fotomultiplicador ou um fotodíodo com um filtro óptico ou monocromator. Opcionalmente, o dispositivo detector de luz pode ser ligado a um amplificador em que o sinal eléctrico do detector de luz é amplificado. A concentração da fracção *ECL* é determinada por técnicas de análise normais conhecidas na técnica.

Numa forma de realização preferida, o processo da presente invenção é utilizado para medir um analito de interesse. Tal como com outras análises *ECL* conhecidas, a fracção *ECL* é utilizada como agente de etiquetagem para quantificar a concentração de um analito de interesse. A fracção *ECL* pode estar ligada como um agente de etiquetagem

ao analito que interessa ou a um reagente utilizado para averiguar a presença do analito (por exemplo, um antígeno ou anticorpo em análises imunológicas). Sendo assim, o processo da presente invenção é particularmente apropriado para utilização com processos analíticos que apresentam baixas exigências de limite de detecção. Os exemplos de tais processos analíticos compreendem, mas não se encontram limitados a, análises de ligação tais como análises imunológicas, análises de hibridação de ácido nucleico, análises de libertação, análises valoradas por retrocesso e sistemas de detecção utilizados em cromatografia, electroforese capilar e análise de injecção de fluxo.

Por exemplo, o processo da presente invenção é utilizado como uma análise imunológica para determinar a concentração de um antígeno ou vários抗ígenos. O antígeno é quantificado incubando um condutor ou vários condutores que têm immobilizados nos mesmos um anticorpo primário com a amostra que contém o antígeno e subsequentemente com um anticorpo secundário ligado a uma fracção ECL. Após incubação durante um período de tempo suficiente, o condutor ou condutores são lavados, sendo que os anticorpos etiquetados não ligados são afastados. O condutor ou condutores são subsequentemente colocados numa célula entre eléctrodos que fornecem corrente, em que a luminescência é induzida e medida de acordo com a presente invenção.

Podem ser utilizadas várias modificações da análise imunológica descrita acima. Por exemplo, utilizando a discriminação de resolução temporal ou espectral podem ser

simultaneamente detectados dois ou mais compostos etiquetados. A etiquetagem dupla acima descrita pode ser estendida a análises não competitivas em que o anticorpo secundário é etiquetado com diferentes fracções *ECL* para alcançar a normalização interna da análise. Alternativamente, podem ser utilizados dois ou mais compostos de etiquetagem exigindo deste modo diferentes electrólitos para a geração de luminescência. Ao alterar o electrólito, podem ser quantificados diferentes compostos e analitos de etiquetagem no mesmo ou diferentes condutores um após o outro.

Do mesmo modo, as variações na dimensão ou material dos condutores permite a edição simultânea de diferentes compostos de luminescência e determinar a concentração de diferentes analitos numa amostra. Por exemplo, dois condutores de diferentes dimensões podem ser revestidos com diferentes anticorpos primários. Os condutores são depois incubados com uma mistura que contém dois antígenos diferentes a serem quantificados e dois anticorpos secundários etiquetados com a mesma fracção de *ECL*. Após um período de tempo suficiente, os condutores são lavados para retirar os anticorpos secundários não ligados. Os condutores são depois colocados numa célula onde a luminescência é induzida pelo aumento gradual da tensão aplicada nos eléctrodos que fornecem a corrente. Conforme a tensão é gradualmente aumentada, a luz é primeiro emitida no condutor maior dado que possui um potencial limite menor do que a sua parte contrária menor. Assim que a queda de tensão na solução electrolítica for suficientemente alta, a luz começa então a

emitir no condutor menor. Outras modificações do processo da presente invenção podem ser facilmente averiguados pelos técnicos.

#### Exemplos

Os seguintes exemplos não limitativos ilustram a utilização de luminescência gerada electricamente sem contacto (COEL). A figura 1 apresenta um diagrama geral do dispositivo a ser utilizado de acordo com a invenção. Em relação à figura 1, é proporcionada uma célula (10) que apresenta paredes de célula (12) que rodeiam o electrólito (14). O electrólito (14) apresenta imerso dentro do mesmo um par de eléctrodos (16, 18) que fornecem a corrente e um condutor (20) posicionado entre os eléctrodos, mas não em contacto electrónico com os eléctrodos. Ligada aos eléctrodos (16, 18) encontra-se uma fonte de corrente (22) que se encontra também ligada a um dispositivo de gravação (24), que por sua vez se encontra ligado a um detector de luz (26) para detectar a luz ( $h\nu$ ) emitida no condutor.

A célula utilizada nos seguintes exemplos era uma célula de politetrafluoroetileno que apresenta as dimensões: C = 16 mm, L = 7 mm, D = 9 mm. Os eléctrodos que fornecem a corrente foram feitos de um fio em aço inoxidável com um diâmetro de 2 mm. Os eléctrodos encontravam-se espaçados a 11 mm um do outro. A fonte da corrente era um gerador de impulsos colestáticos caseiro passível de gerar impulsos quadrados de 60 volts (V) e 0,4 milissegundos (ms). O detector de luz era um fotomultiplicador Hamamatsu, modelo N°. R3550. O sinal detectado foi amplificado com um pré-amplificador Stanford

Research modelo n° SR455. O sinal amplificado foi contado com um contador de fotões Stanford Research modelo N°. SR400. O contador de fotões foi ligado a um computador para controlar o sistema de medição e armazenamento de dados.

Embora a corrente eléctrica seja o factor primário para a queda de tensão nos condutores e deste modo para a geração de luminescência, devido a razões instrumentais somente a tensão aplicada aos eléctrodos de fornecimento de corrente é aplicada nos exemplos 1 a 6.

#### Exemplo 1

##### Luminescência gerada electricamente sem contacto com luminol

Soluções amostra foram preparadas dos seguintes componentes:  $5,0 \times 10^{-2}$  de tampão de borato ajustado para pH 7,8,  $7,1 \times 10^{-2}$  M de azida de sódio e quantidades variáveis de luminol (isto é 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona). A luminescência gerada electricamente sem contacto (COEL) foi iniciada à superfície de um condutor de alumínio esférico com 6,3 mm de diâmetro (condutor Al) (AbbotBall Company) tal como se segue: impulsos de excitação de 0,4 milissegundos de duração e 60 V de amplitude com o nível zero de 10 ms intermitentes foram aplicados aos eléctrodos que fornecem a corrente resultando numa corrente de pico de aproximadamente 50 mA na solução amostra. A emissão de luz resultante (isto é a resposta COEL) do condutor Al foi detectada pelo fotomultiplicador. A resposta COEL integrada dos 500 impulsos de excitação com uma função da concentração de luminol nas Soluções amostra encontram-se apresentadas no quadro 1 e

figura 2. A resposta COEL de fundo (isto é a resposta sem o condutor Al na célula da amostra) foi de aproximadamente 50 vezes menor do que a resposta COEL de fundo análoga no quadro 1.

Quadro 1

Resposta COEL como uma função da concentração de luminol

[Luminol]/mol l <sup>-1</sup>	COEL/au
0	7563
1,0 x 10 <sup>-11</sup>	7490
1,0 x 10 <sup>-10</sup>	15839
1,0 x 10 <sup>-9</sup>	58352
1,0 x 10 <sup>-8</sup>	363900
1,0 x 10 <sup>-7</sup>	2381000

### Exemplo 2

Luminescência gerada electricamente sem contacto com Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>

As soluções de amostras foram preparadas dos seguintes componentes: 1,12x10<sup>-1</sup> M potássio diidrogeno fosfato e tampões 8,80 x 10<sup>-2</sup> M dipotássio hidrogeno fosfato a pH 7,2, 1,0 x 10<sup>-1</sup> M tripropilamina, 7,1 x 10<sup>-2</sup> M de azida de sódio e quantidades variáveis de tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) (Ru(b-py)<sub>3</sub><sup>2+</sup>). A luminescência gerada electricamente sem contacto (COEL) foi iniciada na superfície de um condutor de ouro esférico com 5,0 mm de diâmetro (condutor Au) (isto é uma bola de vidro coberta com uma camada de ouro evaporada em vácuo) tal como se segue: impulsos de excitação de 0,4 ms de duração e 6,0 V de

amplitude com o nível zero intermitente de 10 ms foram aplicados aos eléctrodos que fornecem a corrente resultando numa corrente de pico de aproximadamente 50 mA na referida solução amostra. A emissão de luz resultante (isto é a resposta COEL) do condutor Au foi detectada pelo fotomultiplicador. As respostas COEL integradas de 500 impulsos de excitação como uma função da concentração  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na solução amostra encontram-se apresentados no quadro 2 e figura 3. A resposta de fundo COEL (isto é a resposta sem o condutor Au na célula da amostra) era de cerca 50 vezes menor do que a resposta COEL de fundo análoga no quadro 2.

Quadro 2

Resposta COEL como uma função da concentração  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] / \text{mol l}^{-1}$	COEL/au
0	853
$1,0 \times 10^{-8}$	11025
$1,0 \times 10^{-7}$	131540
$1,0 \times 10^{-6}$	942059
$1,0 \times 10^{-5}$	6715220

Exemplo 3

Luminescência gerada electricamente sem contacto com téribio (III)-1

Soluções amostra foram preparadas dos seguintes componentes: tampão de borato  $5,0 \times 10^{-2}$  M ajustado para pH 7,8,  $7,1 \times 10^{-2}$  M azida de sódio e várias quantidades de

quelatos de Tb(III)-1 em que 1 é 2,6-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-4-benzoilfenol. A COEL foi iniciada na superfície de um condutor Al esférico com 6,3 mm de diâmetro (AbbotBall Company) tal como se segue: impulsos de excitação de 0,4 ms; duração e 60 V de amplitude com nível zero intermitente a 100 ms foram aplicados aos eléctrodos que fornecem a corrente resultando numa corrente de aproximadamente 50 mA nas referidas Soluções amostra. A emissão de luz resultante do condutor Al foi detectada pelo fotomultiplicador durante o intervalo de 0,08 - 8,0 ms do fim do impulso de excitação de 0,4 ms (isto é uma resposta COEL atrasada ou, abreviado, uma resposta DCOEL). A resposta DCOEL integrada dos 500 impulsos de excitação como uma função da concentração de térbio (III) nas Soluções amostra encontram-se apresentadas no quadro 3 e figura 4. A resposta DCOEL de fundo (isto é a resposta sem o condutor Al na célula da amostra) foi de cerca de 5000 vezes menor do que a resposta DCOEL de fundo análoga no quadro 3.

Quadro 3

Resposta DCOEL como uma função da concentração de térbio(III)-1

[Tb(III)-1]/mol l <sup>-1</sup>	DCOEL/au
0	10054
$1,0 \times 10^{-9}$	46499
$1,0 \times 10^{-8}$	337576
$1,0 \times 10^{-7}$	4001260

#### Exemplo 4

Análises imunológicas da hormona de estimulação da tireóide humana

(hTSH) pela luminescência gerada electricamente sem contacto

A. Preparação do composto de etiquetagem

Foi utilizado um complexo de térbio (III) com 4-(3-isotiocianatobenzoil)-2,6-bis[N,-N-bis(carboximetil)aminometil]fenol como o composto de etiquetagem e foi sintetizado tal como descrito em J. Kankare et. Al., Anal. Chim. Acta, 266:205 (1992), que é incorporado na presente como referência.

B. Etiquetagem de anti-hTSH IgG

Foi permitido a um excedente em 60 vezes de complexo de térbio (III) 4-(3-isotiocianatobenzoil)-2,6-bis[N,-N-bis(carboximetil)aminometil]fenol reagir durante a noite com anti-hTSH IgG (Oy Medix Biochemica Ab, Kauniainen, Finlândia) a pH 9,5. O anticorpo etiquetado foi separado do complexo de térbio (III) livre excedente numa coluna cheia com Sephadex G-50(1,0 x 5,5 cm) e Sepharose 6 B(1,0 x 5,2 cm) utilizando tampão de carbonato de sódio  $1,0 \times 10^{-1}$  M a pH 9,3, contendo 9 g  $1^{-1}$  de cloreto de sódio e 0,5% de azida de sódio como agente eluiente.

C. Revestimento dos condutores de alumínio

Os condutores Al com 6,3 mm de diâmetro (AbbotBall Company) foram revestidos com anti-hTSH IgG por uma adsorção física com tampão  $5,0 \times 10^{-1}$  M Tris-HCl a pH 7,5, contendo cloreto de sódio 9 g  $1^{-1}$  e 0,05% de azida de sódio. A mistura da reacção foi deixada durante a noite à temperatura ambiente. Após o revestimento, os condutores Al foram lavados com uma solução contendo 9 g  $1^{-1}$  cloreto de sódio, 0,01% de

azida de sódio 0,2 g l<sup>-1</sup> Tween, e saturados com 0,1% BSA (albumina de soro de bovino) durante a noite e armazenado húmido a 4° centígrados.

#### D. Análises imunológicas de *hTSH*

Um amarelo de 100 µl de uma norma apropriada contendo um 0,1, 10, 100 ou 1000 µU ml<sup>-1</sup> de *hTSH* (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia) foi adicionado num tubo de ensaio de 300 µl seguido de 14,5 µl de uma solução anti-*hTSH* etiquetada com térbio (III) em que 23,4 µg ml<sup>-1</sup> do anti-*hTSH* etiquetado com térbio (III) foram dissolvidos em 5,064 ml de 5,0 x 10<sup>-2</sup> M de tampão TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 7,8 contendo adicionalmente cloreto de sódio 9 g l<sup>-1</sup>, 5 g l<sup>-1</sup> de BSA, 0,5 g l<sup>-1</sup> de azida de sódio, 0,5 g l<sup>-1</sup> de globulina γ de bovino, 0,1 g l<sup>-1</sup> Tween 20, 7,9 mg l<sup>-1</sup> DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacetico). O condutor Al revestido e lavado foi colocado no tubo de ensaio anteriormente mencionado. Após uma hora de incubação agitando continuamente, o condutor Al foi lavado duas vezes durante dois minutos com 400 µl 5,0 x 10<sup>-2</sup> M de tampão TRIS-HCl a pH 7,4 contendo adicionalmente 0,05% de azida de sódio, 0,2% BSA, 0,1% Tween. O condutor Al foi depois transferido para a célula COEL contendo 5,0 x 10<sup>-2</sup> M de tampão H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 7,8 e 1,0 x 10<sup>-2</sup> M de azida de sódio. A resposta DCOEL foi medida seguindo o procedimento do exemplo 3, sendo os resultados apresentados no quadro 4 e figura 5

Quadro 4

Análises imunológicas de <i>hTSH</i> por luminiscência gerada electricamente sem contacto
--

$htSH/\mu\text{U ml}^{-1}$	DCOEL/au
0	471
1	650
10	1070
100	4380
1000	13620

Exemplo 5

Análise multicomponente

Por luminescência gerada electricamente sem contacto

Soluções amostra foram preparadas dos seguintes componentes:  $5,0 \times 10^{-2}$  M de tampão do borato ajustado para pH 7,8,  $3,0 \times 10^{-3}$  M de peróxidisulfato e  $1,0 \times 10^{-3}$  M Tween (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano e quantidades variáveis de  $\text{Ru}(\text{Bpy})_3^{2+}$  e quelato de Tb(III)-1. A COEL foi iniciada à superfície de um condutor Al esférico com 6,3 mm de diâmetro (AbbotBall Company) tal como se segue: impulsos de excitação de 0,4 ms de duração e 60 V de amplitude com o nível zero intermitente de 100 ms foram aplicados aos eléctrodos que fornecem a corrente resultando numa corrente de aproximadamente 50 mA na referida solução amostra. A emissão de luz resultante do condutor Al foi detectada pelo fotomultiplicador durante o impulso de excitação (isto é, uma resposta COEL) e durante o intervalo de 0,08 - 8,0 ms do fim do impulso de excitação de 0,4 ms (isto é uma resposta COEL atrasada ou DCOEL). As respostas COEL e DCOEL integradas dos 500 impulsos de excitação encontram-se apresentadas no quadro 5 e figura 6: a resposta DCOEL pode ser utilizada para a quantificação de Tb(III)-1 nestas misturas da amostra porque

a COEL de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  teve uma vida demasiado curta para alcançar a janela de detecção de 0,08 - 8,0 ms, enquanto que a resposta COEL apresentada (isto é a resposta COEL observada subtraída da resposta COEL de Tb(III)-1 que por sua vez, é estimada da resposta DCOEL medida) pode ser utilizada para a quantificação de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .

Quadro 5

Resposta COEL e DCOEL como uma função das concentrações Tb(III)-1 e

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  combinadas

[Tb(III)-1 + [ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ] / mol <sup>-1</sup>	COEL de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / au	DCOEL de Tb(III)-1/au
$1,0 \times 10^{-8} + 1,0 \times 10^{-6}$	335772	36377
$1,0 \times 10^{-7} + 1,0 \times 10^{-6}$	382782	317303
$1,0 \times 10^{-6} + 1,0 \times 10^{-6}$	1383670	2933600
$1,0 \times 10^{-7} + 1,0 \times 10^{-7}$	34376	377757
$1,0 \times 10^{-7} + 1,0 \times 10^{-6}$	382782	317303
$1,0 \times 10^{-7} + 1,0 \times 10^{-5}$	1697352	395255

#### Exemplo 6

Luminescência gerada electricamente sem contacto  
selectiva na dimensão

Uma solução amostra foi preparada dos seguintes componentes:  $1,12 \times 10^{-1}$  M fosfato de potássio dihidrogenado e  $8,80 \times 10^{-2}$  M de tampão de fosfato de potássio hidrogenado a pH 7,2,  $1,0 \times 10^{-1}$  M tripropilamina,  $7,1 \times 10^{-2}$  M de azida de sódio e  $1,0 \times 10^{-8}$  M tris(2,2'bipiridil)ruténio(II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ). A COEL foi iniciada separadamente na superfície dos condutores de ouro esféricos (condutores Au) com os

diâmetros apresentados no quadro 6 (isto é, uma bola de vidro coberta com uma camada de ouro evaporada em vácuo) aplicando uma tensão de excitação CC de 0 V a 20 V nos eléctrodos de fornecimento de corrente a uma velocidade de varrimento de  $0,25 \text{ V s}^{-1}$  na solução amostra. As respostas COEL resultantes de  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$  de diferentes condutores Al foram detectadas pelo fotomultiplicador e são apresentadas na figura 7 (2,0 mm (-.-), 2,5 mm (.....), 3,5 mm (---) e 6,0 mm (\_\_\_\_)). As voltagens de pico e intensidades de COEL de  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$  utilizando os diferentes condutores Au encontram-se apresentadas no quadro 6.

Quadro 6

Tensões de pico e intensidades de pico na COEL  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$  nos electroluminogramas obtidos utilizando diferentes condutores Au

Diâmetro do condutor Au/mm	Tensões de pico/V	COEL de $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$ /Au
2,0	14,0	4600
2,5	10,5	10600
3,5	8,9	46300
6,0	5,7	157000

Lisboa, 29 de Julho de 2008

### Reivindicações

1. Processo para gerar luminescência de um composto luminescente para a quantificação do referido composto luminescente, que compreende: proporcionar um electrólito que apresenta dentro do mesmo (i) um par de eléctrodos que fornece a corrente, (ii) um material condutor eléctrico posicionado entre os referidos eléctrodos, mas não em contacto electrónico com os referidos eléctrodos, e (iii) encontrando-se o referido composto luminescente em contacto electrónico com o referido material condutor eléctrico; e aplicar uma corrente eléctrica aos referidos eléctrodos induzindo deste modo o referido composto luminescente à luminescência.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido processo compreender adicionalmente medir a referida luminescência para quantificar a concentração do referido composto luminescente.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material condutor eléctrico ser material electroquimicamente inerte.
4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido material electroquimicamente inerte ser carbono vítreo, ouro, platina ou misturas dos mesmos.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material condutor eléctrico ser um metal isolado ou semimetal.
6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido material isolado ou semimetal ser isolado com um óxido ou revestimento polímero.
7. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido metal ou semimetal ser alumínio, hâfnio, magnésio, silício, tântalo, titânio, zircónio ou misturas dos mesmos.
8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material condutor eléctrico ser uma membrana porosa coberta com uma camada fina de um material electroquimicamente inerte ou um metal isolado ou semimetal.
9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material condutor eléctrico ser uma combinação de um material electroquimicamente inerte e um material isolado ou semimetal.
10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido material condutor eléctrico compreender adicionalmente um material magnético.

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido electrólito conter pelo menos dois materiais condutores eléctricos.
12. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido electrólito conter pelo menos dois diferentes tipos de materiais condutores eléctricos.
13. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o referido electrólito ser um electrólito aquoso.
14. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o referido electrólito ser um electrólito não aquoso.
15. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido composto luminescente se encontrar fixado à superfície do referido material condutor eléctrico.
16. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido composto luminescente estar ligado a um analito de interesse.
17. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida luminescência ser medida após um atraso do término da referida corrente eléctrica aplicada aos referidos eléctrodos fornecedores de corrente.

18. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a referida luminescência resultar de pelo menos dois compostos luminescentes diferentes.
19. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por a referida luminescência ser formada à superfície de pelo menos dois tipos diferentes de materiais condutores eléctricos.
20. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a referida luminescência nas superfícies dos referidos diferentes materiais condutores eléctricos ser iniciada e medida a diferentes níveis de corrente passando através dos eléctrodos fornecedores de corrente.
21. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por as medições de dois ou mais compostos luminescentes químicos em diferentes condutores serem utilizadas para a normalização interna.
22. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por as medições de dois ou mais compostos luminescentes em diferentes condutores serem actualizadas para determinar a concentração de dois ou mais analitos.
23. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido analítico de interesse ser uma sequência de ácido nucleico.

24. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido analito ser uma sequência de amino ácido.

Lisboa, 29 de Julho de 2008

Figura 1

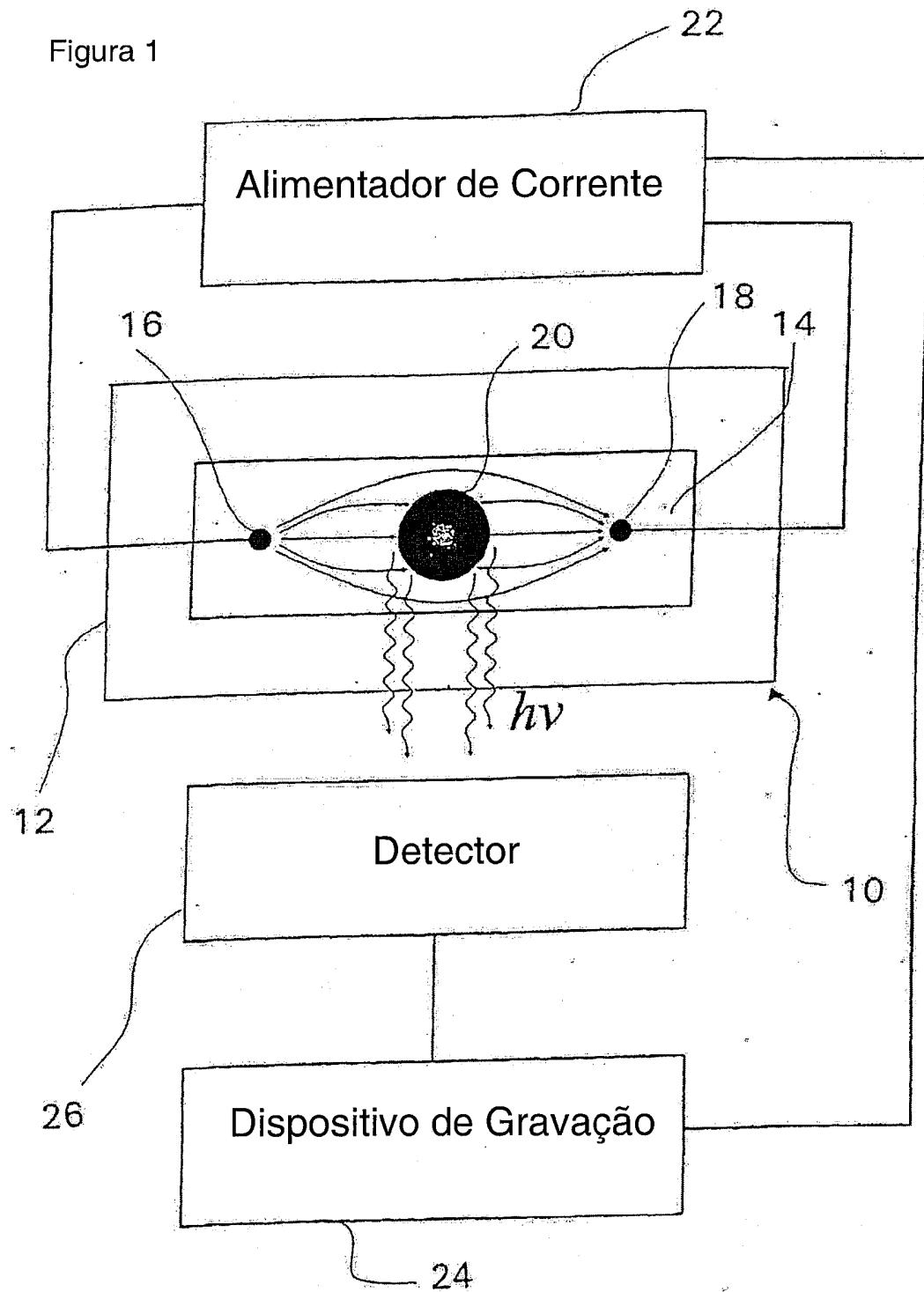


Figura 2

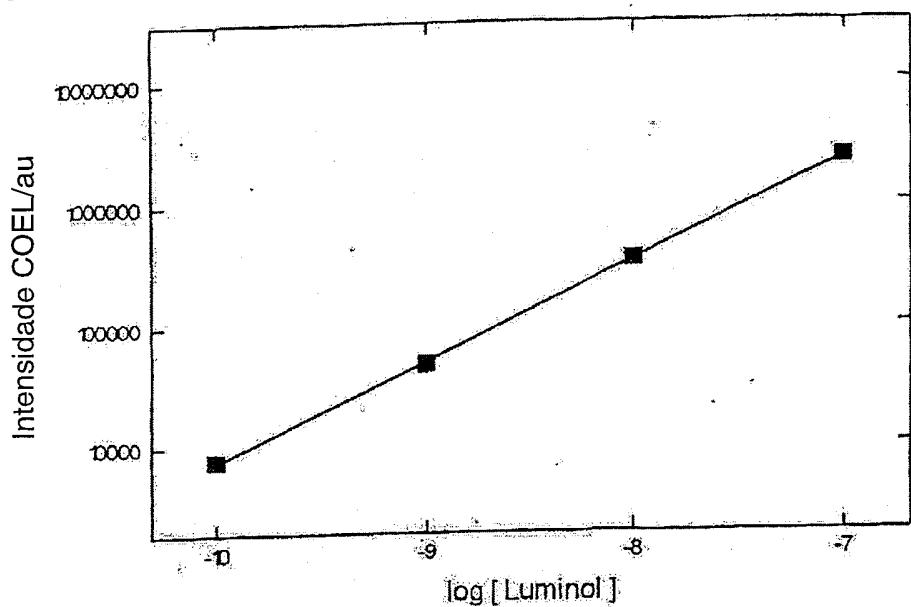


Figura 3

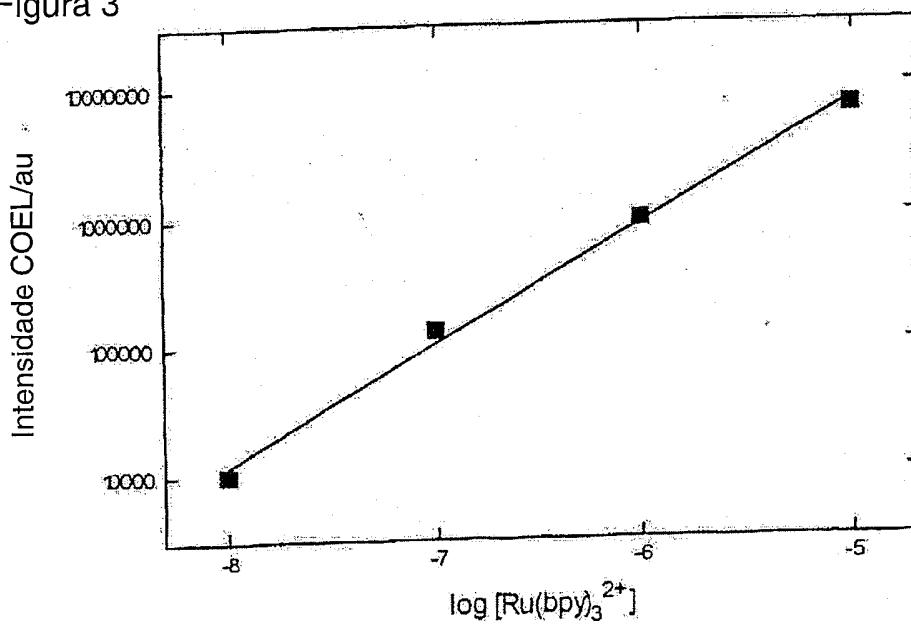


Figura 4

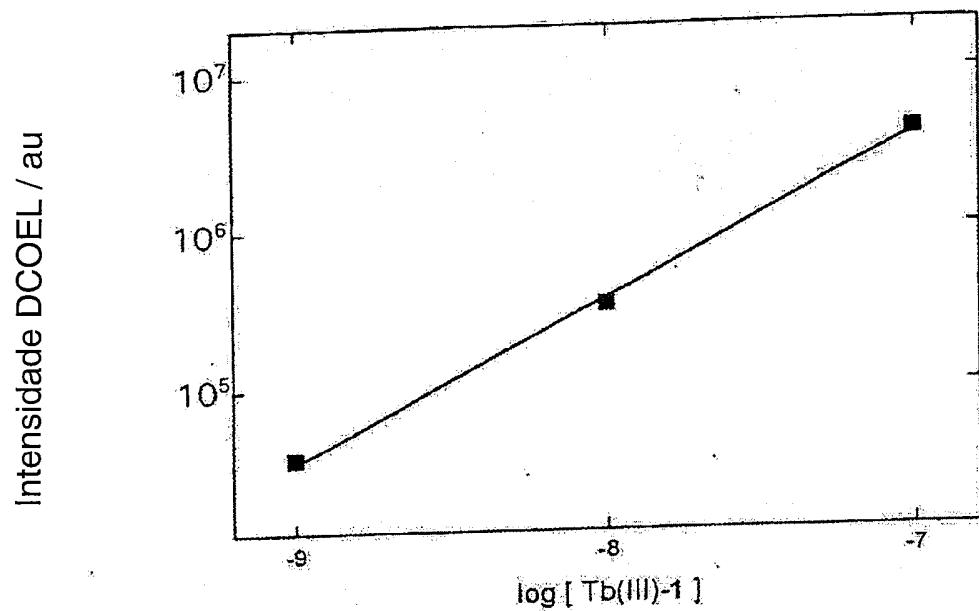


Figura 5

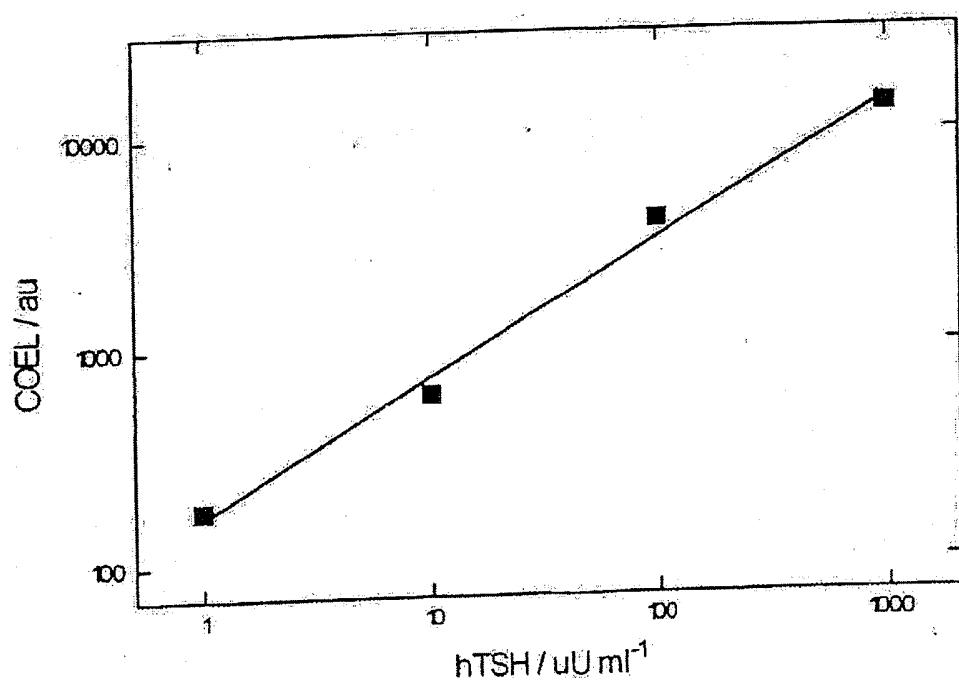


Figura 6

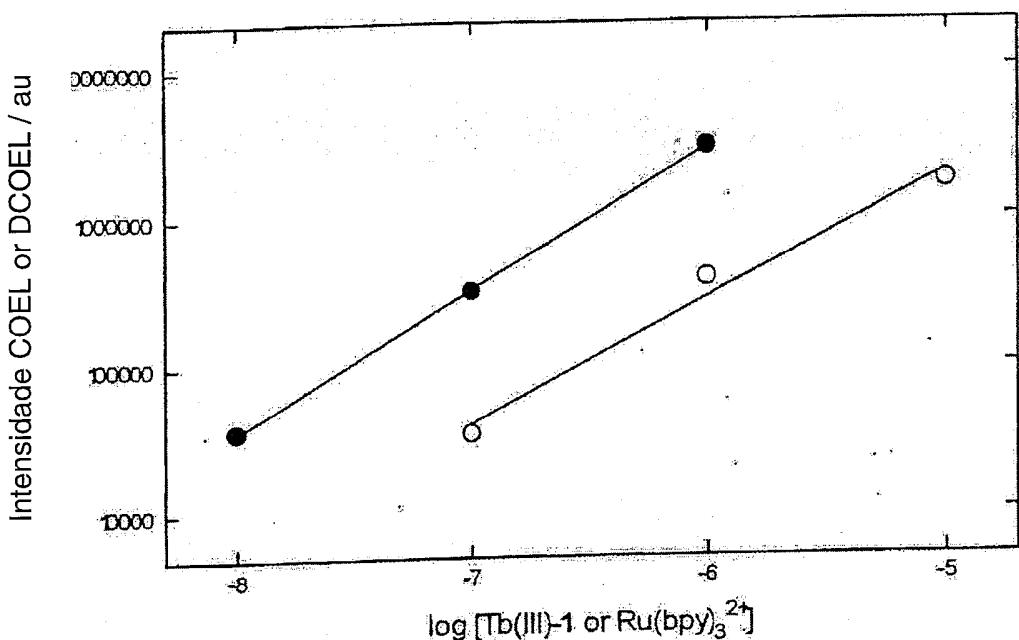


Figura 7

