

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 473**

51 Int. Cl.:

**G01N 25/18** (2006.01)

**G01N 33/487** (2006.01)

**G01N 33/544** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**B01J 20/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2016 PCT/EP2016/076571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17084885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2016 E 16791009 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023 EP 3377881**

54 Título: **Dispositivos y métodos para la detección de analitos mediante el uso de ondas térmicas**

30 Prioridad:

**16.11.2015 EP 15194837**

**29.03.2016 EP 16162550**

**29.03.2016 EP 16162685**

**29.03.2016 US 201662314461 P**

**11.04.2016 EP 16164636**

**11.04.2016 US 201615095636**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.05.2023**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)**

**Minderbroedersweg 4-6**

**6211 LK Maastricht, NL y**

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRINSVEN, VAN, BART ROBERT NICOLAAS y**

**CLEIJ, THOMAS JAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 940 473 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**

Dispositivos y métodos para la detección de analitos mediante el uso de ondas térmicas

5 Campo técnico

Las modalidades de la presente descripción se refieren generalmente a dispositivos y métodos para detectar analitos mediante el uso de materiales poliméricos, tal como sobre un disipador de calor configurado para producir una onda térmica.

10

Antecedentes

Los polímeros impresos molecularmente (MIP) pueden usarse para detectar sustancias químicas en mezclas complejas. En la investigación moderna, estos polímeros son de creciente interés para aplicaciones bioanalíticas. Las ventajas de usar estos MIP incluye una producción fácil y económica; estabilidad mecánica, química y térmica; reutilización; y larga vida útil. En los últimos años, el concepto de impresión molecular se ha extendido a la impresión superficial de películas delgadas de polímero con células del tamaño de un micrómetro para crear los llamados "polímeros impresos en la superficie" (SIP) para la detección de proteínas, glicoproteínas, virus de plantas, virus humanos, bacterias, polen, células de levadura e incluso glóbulos rojos de mamíferos. Los SIP son materiales poliméricos con muescas en la superficie, con una forma y una función que coinciden con parte de un objetivo deseado. Los SIP son adecuados para vincularse con objetos más grandes (por ejemplo, células, bacterias, etc.), que no se difunden rápidamente a través de los poros de un MIP. La impresión puede ocurrir después de la polimerización al ablandar el polímero. La detección de células mediante el uso de biosensores descritos en la literatura se realiza convencionalmente mediante detección gravimétrica, plataformas de lectura electrónica o técnicas de microfluidos. Sin embargo, estas técnicas a menudo consumen mucho tiempo, presentan dificultades para el análisis o requieren equipos costosos.

20

Por ejemplo, la resistencia a la temperatura de los sustratos que tienen MIP unidos a ellos en función de la concentración de analitos se describe en la Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0011198 A1, "Heat-Transfer Resistance Based Analysis Bioparticles," publicado el 9 de enero de 2014.

30

Otras descripciones del estado de la técnica que describen técnicas para detectar analitos mediante el uso del método de transferencia de calor son el documento EP2772753y el documento técnico "The Heat-Transfer Method: A Versatile Low-Cost, Label-Free, Fast, and User-Friendly Readout Platform for Biosensor Applications", Bart van Grinsven y otros. ACS APPLIED MATERIALS AND INTERFACES, vol. 6, núm. 16, 8 de agosto de 2014.

35

El documento US6161028 describe un método para determinar una concentración de analito de una muestra de prueba introduciendo un gradiente de temperatura y midiendo la radiación infrarroja en el pico de absorbancia del analito seleccionado y longitudes de onda de referencia.

40

El documento JP2005-345385 describe un instrumento de medición capaz de medir diversas características térmicas de una muestra tales como conductividad térmica, propiedad de aislamiento térmico, etc.

Una plataforma de sensores de bajo costo que proporcione la capacidad de diferenciar entre células con ligeras diferencias en forma, tamaño y funcionalidades en grupos funcionales en su superficie sería una herramienta valiosa para la investigación y la industria modernas.

45

Descripción

De acuerdo con la invención, se proporciona un dispositivo para detectar un analito como se describió en la reivindicación 1.

50

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar un analito como se describió en la reivindicación.

55

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para formar el dispositivo anterior para detectar un analito como se describió en la reivindicación 20.

60

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama esquemático simplificado que muestra un dispositivo para detectar un analito; La figura 2 es una representación esquemática simplificada que muestra cómo puede viajar una onda térmica en el dispositivo de la figura 1; La figura 3 es un diagrama esquemático simplificado que muestra otro dispositivo para detectar un analito; La figura 4 es un gráfico que muestra isotermas de unión para dopamina medidas de acuerdo con un ejemplo que no forma parte de la presente invención;

65

La figura 5 es un gráfico que muestra las curvas de calibración para la dopamina medida de acuerdo con un ejemplo que no forma parte de la presente invención;

La figura 6 es un gráfico que muestra los cambios de temperatura medidos de acuerdo con un ejemplo que no forma parte de la presente invención;

5 La figura 7 es un gráfico que muestra valores de resistencia térmica dependientes del tiempo medidos de acuerdo con un ejemplo que no forma parte de la presente invención;

La figura 8 es un gráfico que muestra los datos de resistencia térmica de la figura 7 en forma de curva dosis-respuesta;

La figura 9 es un gráfico que muestra una onda térmica generada de acuerdo con una modalidad de la invención;

10 La figura 10 es un gráfico que muestra las ondas térmicas medidas después de atravesar un sustrato de acuerdo con una modalidad de la invención;

La figura 11 es un gráfico que muestra el cambio de fase de las ondas térmicas mostradas en la figura 10 medido de acuerdo con una modalidad de la invención;

15 La figura 12 es un gráfico que muestra las ondas térmicas medidas después de atravesar un sustrato de acuerdo con una modalidad de la invención;

La figura 13 es un gráfico que muestra el cambio de fase de las ondas térmicas que se muestran en la figura 12 medido de acuerdo con una modalidad de la invención.

#### 20 Modos para llevar a cabo la invención

Las ilustraciones presentadas en la presente descripción no son vistas reales de ningún dispositivo o método en particular, sino que son simplemente representaciones idealizadas empleadas para describir modalidades ilustrativas de la presente invención.

25 Los elementos comunes entre figuras pueden conservar la misma designación numérica.

Como se usa en la presente descripción, los términos "molécula molde" y "bacteria molde" se refieren respectivamente a moléculas o bacterias usadas para formar un polímero impreso molecularmente (MIP) o un polímero impreso en superficie (SIP). Dichos MIP o SIP pueden detectar entonces "moléculas objetivo" o "compañeros de unión", que tienen una funcionalidad correspondiente a las moléculas molde usadas para formar el MIP o SIP.

30

Como se usa en la presente descripción, el término "puede" abarca la palabra "puede" y el término "puede ser" abarca las palabras "es" o "son", en dependencia del contexto. Además, la presencia de la palabra "puede" pretende indicar opciones para practicar o implementar modalidades de la descripción, sin limitación.

35

La figura 1 es un diagrama esquemático simplificado que muestra un dispositivo 100 para detectar un analito. En algunas modalidades, el dispositivo 100 puede configurarse para detectar una molécula objetivo, un ácido nucleico tal como ADN y/o ARN, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en ADN y/o ARN, moléculas pequeñas, proteínas, bacterias, etc.

40

El dispositivo 100 incluye un sustrato 110 que tiene un material polimérico 112 ubicado sobre una superficie del mismo. Por ejemplo, el material polimérico 112 se puede formar o disponer sobre una superficie generalmente plana del sustrato 110, y otra superficie generalmente plana opuesta del sustrato 110 puede estar libre del material polimérico 112. En algunas modalidades, el sustrato 110 puede incluir un metal (por ejemplo, aluminio), una aleación, un semiconductor (por ejemplo, silicio, diamante dopado, etc.), un material eléctricamente aislante (por ejemplo, diamante sin dopar). El material polimérico 112 incluye cualquier material cuya propiedad de transferencia de calor varíe en función de la cantidad del analito unido al mismo. Por ejemplo, la conductividad térmica, la difusividad térmica, la capacidad calorífica u otra propiedad del material polimérico 112 pueden variar con la concentración del analito en su superficie.

50

En algunas modalidades, el material polimérico 112 puede incluir un polímero impreso, tal como un polímero impreso molecularmente (MIP) o un polímero impreso en superficie (SIP). Los MIP y los SIP también pueden denominarse en la técnica anticuerpos "plásticos". Los MIP normalmente poseen una alta afinidad por un compañero de unión específico, de modo que cuando tales compañeros de unión se ponen en contacto con el MIP, las moléculas se unen con el MIP. Los MIP son receptores sintéticos que contienen nanocavidades con alta afinidad por sus respectivas moléculas objetivo. La impresión (es decir, formación de las nanocavidades) es a menudo parte del proceso de polimerización. Los MIP pueden unirse específicamente a los objetivos, incluidas bacterias, que varían desde iones pequeños hasta células grandes en matrices complejas. La unión de moléculas al MIP puede alterar algunas propiedades del MIP, tal como propiedades térmicas, propiedades mecánicas, propiedades eléctricas, etc. La propiedad alterada de un MIP puede, por lo tanto, usarse para detectar la presencia de dichas moléculas en concentraciones relativamente bajas. Los MIP se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0281272 A1, "Monodisperse Molecularly Imprinted Polymer Beads," publicado el 12 de noviembre de 2009.

60

65

De manera similar, los SIP suelen poseer una alta afinidad por un compañero de unión específico, pero normalmente pueden unirse a objetos relativamente más grandes (por ejemplo, células, bacterias, etc.) que no se difunden rápidamente a través de los poros de un MIP. Los SIP pueden ser materiales poliméricos formados sobre una superficie y luego impresos después de la polimerización mediante el ablandamiento del polímero.

En ciertas modalidades, el material polimérico 112 puede incluir ADN, ARN, proteínas o porciones o análogos de los mismos. Por ejemplo, el dispositivo 100 puede incluir un sustrato 110 (por ejemplo, una superficie de diamante) funcionalizado con un material polimérico 112 tal como ADN, ARN, una proteína, un polipéptido, un polímero de ácido nucleico, una sonda o una porción o análogo del mismo (por ejemplo, ADN complementario, anticuerpos, etc.). El material polimérico 112 se puede formular para que posea una alta afinidad por un compañero de unión específico, de modo que cuando tales compañeros de unión se pongan en contacto con la superficie del sustrato 110, las moléculas se unan con el material polimérico 112. El material polimérico 112 también puede unirse a análogos del compañero de unión (por ejemplo, un material que tenga una funcionalidad similar a la del compañero de unión), aunque no necesariamente con la misma afinidad que la unión con el propio compañero de unión. En algunas modalidades, el material polimérico 112 puede incluir al menos siete (7) unidades repetitivas, tal como diez (10) unidades repetitivas o más.

En algunas modalidades, el material polimérico 112 puede incluir un material serigrafiado sobre el sustrato 110. Los materiales serigrafiados se pueden fabricar de manera eficiente y en cantidades masivas, con una uniformidad relativamente alta en comparación con otros materiales.

El dispositivo 100 incluye además un disipador de calor 114 acoplado térmicamente a una superficie del sustrato 110 opuesta al material polimérico 112. Aunque se denomina "disipador" de calor por motivos de simplicidad, el disipador de calor 114 puede configurarse para proporcionar calor o eliminar calor del sustrato 110 y, por lo tanto, también puede caracterizarse como un elemento de transferencia de calor 114. El disipador de calor o el elemento de transferencia de calor 114 puede ser un material que tenga una alta conductividad térmica, tal como un metal de transición (por ejemplo, cobre, plata, etc.) o una aleación o una mezcla de los mismos. El disipador de calor 114 puede acoplarse térmicamente a un sensor de temperatura 116 (por ejemplo, un termopar u otro dispositivo) configurado para detectar una temperatura del disipador de calor 114. De acuerdo con la invención, el disipador de calor o elemento de transferencia de calor 114 está acoplado térmicamente a un dispositivo de modificación de temperatura 118 y puede configurarse para mantener la temperatura del disipador de calor 114. El dispositivo de modificación de temperatura 118 puede incluir, por ejemplo, un dispositivo termoeléctrico, un intercambiador de calor, un ventilador, un calentador de resistencia, etc. El sensor de temperatura 116 puede ser una resistencia que tenga una resistencia que varíe con la temperatura. Si se conocen las propiedades del disipador de calor 114 (por ejemplo, si se caracteriza bien la relación entre una señal de control al dispositivo de modificación 118 y la temperatura del disipador de calor 114), se puede omitir el sensor de temperatura 116. En algunas modalidades, el sensor de temperatura 116 puede ser parte integral del dispositivo de modificación de temperatura 118. Por ejemplo, la resistencia interna del propio dispositivo de modificación de temperatura 118 puede medirse para determinar su temperatura.

El sensor de temperatura 116 y el dispositivo de modificación de temperatura 118 pueden conectarse a un controlador 121 configurado (es decir, programado) para controlar el dispositivo de modificación de temperatura 118 para hacer que el disipador de calor 114 produzca una onda térmica que emana del disipador de calor 114 y a través del sustrato 110 (incluido el material polimérico 112 sobre el mismo). Por ejemplo, el controlador 121 y un procesador 123 pueden incorporarse a una computadora 120 (por ejemplo, el controlador 121 puede ser una tarjeta de entrada-salida configurada para recibir y proporcionar señales eléctricas, y puede configurarse para recibir señales del procesador 123). En algunas modalidades, el controlador 121 puede ser un controlador proporcional integral derivado (PID) capaz de cambiar la temperatura del disipador de calor 114 en una pequeña cantidad en una escala de tiempo relativamente corta. Por ejemplo, el controlador 121 puede cambiar la temperatura del disipador de calor 114 en aproximadamente 0,5 °C o menos, aproximadamente 0,2 °C o menos, o incluso aproximadamente 0,05 °C o menos. Así, la onda térmica puede tener una amplitud de aproximadamente 1,0 °C o menos, aproximadamente 0,4 °C o menos, o incluso aproximadamente 0,10 °C o menos. El controlador 121 puede ser capaz de cambiar la temperatura del disipador de calor 114 a través del dispositivo de modificación de temperatura 118 de un punto de ajuste a otro y viceversa para formar una onda térmica que tenga una frecuencia de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,5 Hz, tal como de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,1 Hz, o desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 Hz. En algunas modalidades, el controlador 121, el dispositivo de modificación de temperatura 118 y el disipador de calor 114 pueden producir juntos una onda térmica que tiene una frecuencia variable. En base a una medición del sensor de temperatura 116 (si está presente), una entrada conocida al dispositivo de modificación de temperatura 118 u otros medios, se pueden conocer las propiedades de la onda térmica (por ejemplo, una fase, amplitud, frecuencia en un momento específico, tasa de cambio de frecuencia, etc.).

El dispositivo 100 incluye además una celda de flujo 122 configurada para pasar un líquido 124 sobre el material polimérico 112 del sustrato 110. La celda de flujo 122 puede definir un vacío 126 adyacente al material polimérico 112 del sustrato 110, así como también una entrada 128 y una salida 130 a través de las cuales puede fluir el líquido 124. Un anillo O 131 u otro mecanismo de sellado apropiado puede retener el líquido 124 dentro de la celda de flujo 122 adyacente al material polimérico 112 sobre el sustrato 110.

El líquido 124 puede incluir un analito 132 que se une específicamente al material polimérico 112 y cambia sus propiedades térmicas, como se describió anteriormente. Por ejemplo, el analito 132 puede incluir una o más cepas de bacterias. El analito 132 (que puede incluir múltiples analitos 132a y 132b) se une específicamente al material polimérico 112 y cambia sus propiedades térmicas, como se describió anteriormente. Si múltiples analitos 132a y 132b están presentes en el líquido 124, los analitos 132a, 132b pueden tener funcionalidades similares, de manera que cada uno de los analitos 132a, 132b se una al material polimérico 112. Los analitos 132a, 132b pueden unirse al material polimérico 112 con diferentes afinidades. En algunas modalidades, el primer analito 132a puede incluir bacterias vivas y el segundo analito 132b puede incluir bacterias muertas de la misma especie. En otras modalidades, el primer analito 132a puede incluir bacterias y el segundo analito 132b puede incluir una bacteria análoga.

Un sensor de temperatura 134 (por ejemplo, un termopar u otro dispositivo) provisto de acuerdo con la invención y configurado para detectar una temperatura del líquido 124 en (por ejemplo, que fluye a través de) la celda de flujo 122. La computadora 120 puede registrar la temperatura del líquido 124, por ejemplo, midiendo una resistencia del sensor de temperatura 134 a través del controlador 121 y/o el procesador 123, y correlacionando esa resistencia con una temperatura. La temperatura del líquido 124 puede ser diferente de la temperatura del disipador de calor 114 y puede variar en función al menos en parte de la presencia o ausencia del analito 132 y su concentración en el líquido 124. Por ejemplo, la resistencia a la temperatura de los sustratos en función de la concentración de analitos se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0011198 A1, "Heat-Transfer Resistance Based Analysis Bioparticles," publicado el 9 de enero de 2014.

De acuerdo con la invención, el procesador 123 está configurado para calcular una concentración del analito 132 en el líquido 124 basándose, al menos en parte, en un cambio de fase entre la onda térmica producida por el disipador de calor 114 y una onda térmica atenuada en el líquido 124 después de que la onda térmica pase a través del sustrato 110 y el material polimérico 112.

La figura 2 es una representación esquemática simplificada que muestra cómo puede viajar la onda térmica en el dispositivo 100 de la figura 1. La figura 2 incluye algunos de los componentes mostrados en la figura 1, pero los muestra separados para permitir la representación de ondas térmicas que viajan a través y entre los componentes. En particular, la figura 2 muestra el disipador de calor 114 acoplado térmicamente al dispositivo de modificación de temperatura 118 y el sensor de temperatura 116, que están conectados a la computadora 120. La concentración del analito 132 se puede medir en base a las diferencias entre la onda térmica en el disipador de calor 114 y la onda térmica en el líquido 124, sin una etapa de calibración separada.

El disipador de calor 114 puede producir una onda térmica 202 y transferir la onda térmica 202 al sustrato 110 y al material polimérico 112 sobre el mismo. Por ejemplo, si el disipador de calor 114 se mantiene inicialmente a una temperatura constante de 37 °C, la onda térmica 202 puede producirse calentando el disipador de calor 114 a una temperatura de 37,1 °C y luego enfriando el disipador de calor 114 a una temperatura de 36,9 °C. El calentamiento y enfriamiento del disipador de calor 114, impulsado por el dispositivo de modificación de temperatura 118, puede hacer que el sustrato 110 y el material polimérico 112 se calienten y enfrién de manera correspondiente. La onda térmica 202 puede tener una amplitud  $\alpha_1$  y una frecuencia  $\phi_1$ . La amplitud  $\alpha_1$  y/o la frecuencia  $\phi_1$  puede variar con el tiempo. Por ejemplo, la onda térmica 202 puede tener una frecuencia continuamente variable  $\phi_1$ .

Como se discutió anteriormente, la presencia o ausencia del analito 132 en el sustrato 110 puede cambiar la conductividad térmica, la difusividad térmica, la capacidad calorífica u otra propiedad del material polimérico 112. La figura 2 ilustra conceptualmente que el material polimérico 112 puede definir cavidades 136 adaptadas para interactuar con al menos una parte del analito 132. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, las cavidades 136 pueden configurarse para actuar para unir específicamente el analito 132. Por lo tanto, el material polimérico 112 puede recibir partículas o moléculas del analito 132 del líquido 124 en algunas de las cavidades 136, en función de la concentración del analito 132 en el líquido 124. El líquido 124 y el material polimérico 112 pueden alcanzar el equilibrio a una temperatura dada, de modo que el analito 132 se una y se separe del material polimérico 112 a velocidades iguales. Las propiedades térmicas del material polimérico 112 pueden depender en parte de la fracción de las cavidades 136 unidas a partículas o moléculas del analito 132.

El sustrato 110 y/o el material polimérico 112 sobre el mismo pueden alterar la onda térmica 202 que lo atraviesa para formar una onda térmica atenuada 204. La onda térmica atenuada 204 puede ser detectada por el sensor de temperatura 134 y registrada por la computadora 120. La onda térmica atenuada 204 puede tener una amplitud  $\alpha_2$  y una frecuencia  $\phi_2$ , que puede ser diferente de la amplitud  $\alpha_1$  y una frecuencia  $\phi_1$  de la onda térmica 202. Las diferencias en las amplitudes  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y/o las frecuencias  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  puede correlacionarse con la cantidad del analito 132 unido al material polimérico 112 y, por lo tanto, con la concentración del analito 132 en el líquido 124. La medida de las diferencias en las amplitudes  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y/o las frecuencias  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  puede permitir que el dispositivo 100 detecte cantidades relativamente más bajas del analito 132 unido al material polimérico 112 (correspondientes a concentraciones más bajas del analito 132 en el líquido 124) en comparación con los métodos convencionales para medir la temperatura del líquido 124 en estado estacionario.

En ciertas modalidades, el analito 132 puede unirse a una superficie no plana. Por ejemplo, la figura 3 es un diagrama esquemático simplificado que muestra otro dispositivo 200 para detectar el analito 132. El dispositivo 200 puede incluir un termopar 210 que tiene un material base 212 formado sobre una superficie del mismo. Por ejemplo, el material de base 212 se puede formar sobre una superficie generalmente cilíndrica del termopar 210, de manera que se encierre todo un extremo del termopar 210. El termopar 210 puede incluir una unión entre dos materiales formulados para proporcionar un voltaje dependiente de la temperatura entre los contactos eléctricos 216, 218. En algunas modalidades, el termopar 210 puede incluir uno o más de un metal (por ejemplo, platino, oro, iridio, paladio, etc.) o una aleación (por ejemplo, una aleación de níquel, una aleación de cobre, una aleación de rodio, una aleación de renio, una aleación de hierro, una aleación de molibdeno, etc.).

El material base 212 puede ser un material polimérico tal como ácido poliláctico (L), que en la técnica se puede denominar PLLA. El PLLA es transparente, económico de producir a partir de fuentes ambientalmente renovables (por ejemplo, productos agrícolas que contienen almidón o azúcar), biodegradable y biocompatible. Además, el PLLA se puede solubilizar en cloroformo para permitir la aplicación al termopar 210. Se puede seleccionar otro material, en lugar de PLLA, para que sea el material base 212, en base a las propiedades deseadas. En algunas modalidades, el material base 212 puede incluir poliuretano, ácido poliláctico, policaprolactona, poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(D,L-lactida-co-glicolida) u otro polímero seleccionado. El material base 212 puede tener la forma de un recubrimiento delgado, suave y homogéneo sobre el exterior del termopar 210. La uniformidad del recubrimiento por el material base 212 puede permitir que el dispositivo 200 produzca resultados reproducibles. El grosor del material base 212 se puede seleccionar en vista de la resistencia térmica del material base 212 para afectar la velocidad a la que el calor puede fluir hacia o desde el termopar 210. Por lo tanto, un material de base más delgado 212 puede ser beneficioso para aplicaciones en las que se desea una respuesta rápida o las diferencias de temperatura son pequeñas.

El material base 212 se puede seleccionar para que muestre al menos algo de elasticidad, de manera que el dispositivo 200 pueda ser flexible para permitir la flexión del termopar 210 sin romper el material base 212. Esto puede permitir que el dispositivo 200 se use para aplicaciones que requieran curvas o espacios reducidos (por ejemplo, el uso en catéteres in vivo).

Un polímero de ensayo 214 puede estar sobre una superficie del material base 212. En algunas modalidades, el polímero de ensayo 214 se puede unir directamente a la superficie del termopar 210 y se puede omitir el material base 212. El polímero de ensayo 214 incluye un material cuya propiedad de transferencia de calor varía en respuesta a la cantidad de analito unido al mismo. Por ejemplo, la conductividad térmica, la difusividad térmica, la capacidad calorífica u otra propiedad del polímero de ensayo 214 pueden variar con la concentración del analito en su superficie.

En algunas modalidades, el polímero de ensayo 214 puede incluir un polímero impreso (un MIP o SIP), ADN, ARN, proteínas o porciones o análogos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos). El polímero de ensayo 214 puede configurarse para poseer una alta afinidad por un compañero de unión específico, de modo que cuando tales compañeros de unión se ponen en contacto con la superficie del termopar 210, las moléculas se unen con el polímero de ensayo 214. En algunas modalidades, el polímero de ensayo 214 incluye al menos siete (7) unidades repetidas, tal como diez (10) unidades repetidas o más.

El dispositivo 200 incluye un procesador 223 programado para calcular una cantidad del analito unido al polímero de ensayo 214. El procesador 223 puede calcular una concentración del analito en un líquido en contacto con el dispositivo 200 basándose al menos en parte en la cantidad del analito unido al polímero de ensayo 214. Por ejemplo, el procesador 223 puede calcular la cantidad del analito por un método como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0011198 A1, "Heat-Transfer Resistance Based Analysis Bioparticles," publicada el 9 de enero de 2014; o la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0242605 A1, "Heat-Transfer Resistance Based Analysis of Bioparticles," publicada el 28 de agosto de 2014. El procesador 223 se usa para detectar un cambio de fase entre una onda térmica en o que emana de un disipador de calor y una onda térmica atenuada en el termopar 210. El procesador 223 puede entonces calcular la concentración del analito en el líquido basándose al menos en parte en una diferencia de amplitud entre la onda térmica en el disipador de calor y la onda térmica atenuada en el termopar 210.

Volviendo de nuevo a la figura 1, el material polimérico 112 puede formarse o proporcionarse de cualquier otra manera sobre el sustrato 110. Por ejemplo, el material de polímero 112 se puede serigrafar en un sustrato de metal 110. La serigrafía se puede realizar de manera eficiente y escalar para producir cantidades masivas, con una uniformidad relativamente alta en comparación con otros métodos. La serigrafía de sustratos se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2012/0186999 A1, "Electrochemical Sensor," publicada el 26 de julio.

El disipador de calor 114 está acoplado térmicamente al sustrato 110 en una superficie opuesta al material polimérico 112. Por ejemplo, el disipador de calor 114 puede colocarse en contacto físico directo con el sustrato 110 de manera que el calor pueda fluir desde el disipador de calor 114 al sustrato 110 por conducción. En algunas modalidades, un material conductor térmico (por ejemplo, una matriz líquida polimerizable que tiene un relleno

conductor térmico) se puede colocar en contacto físico con el disipador de calor 114 y el sustrato 110 para eliminar los espacios de aire entre el disipador de calor 114 y el sustrato 110. De manera similar, el dispositivo de modificación de temperatura 118 puede acoplarse térmicamente al disipador de calor 114 por contacto físico directo, a través de un material conductor térmico o por otros medios apropiados.

El controlador 121 (por ejemplo, un controlador PID) puede estar conectado eléctricamente al dispositivo de modificación de temperatura 118 para proporcionar energía suficiente para controlar la temperatura del disipador de calor 114 y hacer que el dispositivo de modificación de temperatura 118 cambie la temperatura del disipador de calor 114 para producir la onda térmica 202 (Figura 2).

La celda de flujo 122 se puede asegurar junto al sustrato 110 de manera que el líquido 124 ingrese a la celda de flujo 122 a través de la entrada 128, entre en contacto con el material polimérico 112 y luego salga de la celda de flujo 122 a través de la salida 130. En algunas modalidades, la celda de flujo 122 se puede conectar al disipador de calor 114 mediante uno o más sujetadores 138 (por ejemplo, tornillos). En otras modalidades, la celda de flujo 122 se puede conectar al disipador de calor 114 mediante roscas integrales o mediante una junta deslizante. El anillo O 131 u otro sello puede configurarse para evitar que el líquido 124 entre en contacto con el disipador de calor 114, el dispositivo de modificación de temperatura 118 o la parte posterior del sustrato 110 directamente.

El sensor de temperatura 134 puede estar dispuesto dentro del vacío 126 de la celda de flujo 122 para medir la temperatura del líquido 124 que fluye a través de la celda de flujo 122. El sensor de temperatura 134 se puede asegurar a la celda de flujo 122 mediante un adhesivo u otro medio apropiado. El sensor de temperatura 134 puede conectarse eléctricamente al procesador 123, que puede incluir un ohmímetro. El procesador 123 puede configurarse para detectar continuamente la temperatura en el sensor de temperatura 134 y para calcular la concentración del analito 132 en el líquido 124 basándose, al menos en parte, en un cambio de fase entre la onda térmica 202 (Figura 2) producida por el disipador de calor 114 y la onda térmica atenuada 204 (Figura 2) en el líquido 124.

El dispositivo 100 mostrado en la figura 1 y descrito anteriormente puede usarse para detectar cualquier analito seleccionado 132, tal como bacterias. Por ejemplo, el dispositivo 100 puede usarse para detectar, detectar y cuantificar analitos biológicos u otros productos químicos en el líquido 124. El dispositivo 100 puede usarse para detectar, detectar y cuantificar cepas particulares de bacterias, ya sea que las bacterias estén vivas o muertas, o discriminar tipos de bacterias en una mezcla compleja. El analito 132 puede ser un gas, líquido o sólido disuelto o mezclado de cualquier otra manera con el líquido 124. Por ejemplo, el dispositivo 100 puede usarse para detectar, medir, cuantificar analitos, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, (por ejemplo, ADN, ARN, etc.), que incluye ácidos nucleicos con secuencias particulares (por ejemplo, SNP), proteínas, moléculas pequeñas (por ejemplo, dopamina, histamina, etc.) u otras sustancias. En algunas modalidades, el dispositivo 100 puede usarse para detectar histamina, dopamina, serotonina, adrenalina, metilfenidato, etc.

Una de las muchas características atractivas de los métodos de impresión molecular como se describe en la presente descripción es que los métodos se pueden aplicar a una amplia gama de analitos. La impresión de pequeñas moléculas orgánicas (por ejemplo, productos farmacéuticos, pesticidas, aminoácidos y péptidos, bases de nucleótidos, esteroides, azúcares, etc.) se describe, por ejemplo, en K. Haupt y K. Mosbach, "Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors," *Chem. Rev.* 100, 2495-2504 (2000); y G. Mustafa y P. Lieberzeit, "MIP Sensors on the Way to Real-World Applications," in *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, vol. 12, págs. 167-187 (Springer, 2012)). También se pueden imprimir compuestos orgánicos algo más grandes (por ejemplo, péptidos) a través de enfoques similares. Se han propuesto protocolos para imprimir estructuras más grandes, tales como proteínas, células y cristales minerales, por ejemplo, en M. Kempe, M. Glad, y K. Mosbach, "An Approach Towards Surface Imprinting Using the Enzyme Ribonuclease A," *J. Molecular Recognition*, 8, 35-39 (1995); S. Hjerten y otros, "Gels Mimicking Antibodies in Their Selective Recognition of Proteins," *Chromatographia* 44, 227-234 (1997); H. Shi y otros, "Template-Imprinted Nanostructured Surfaces for Protein Recognition," *Nature* 398, 593-597 (1999); A. Aherne y otros, "Bacteria-Mediated Lithography of Polymer Surfaces," *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8771-8772 (1996); y S. M. D'Souza, y otros, "Directed Nucleation of Calcite at a Crystal-Imprinted Polymer Surface," *Nature* 398, 312-316 (1999). La impresión molecular como puente para la administración avanzada de fármacos se describe en B. Sellergren y C. Allender, "Molecularly Imprinted Polymers: A Bridge to Advanced Drug Delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1733-1741 (2005).

Para detectar el analito 132, el líquido 124 que contiene el analito 132 puede pasar a través de la celda de flujo 122, adyacente y en contacto con el material polimérico 112 sobre el sustrato 110. El analito 132 (por ejemplo, partículas, moléculas o bacterias) se une al material polimérico 112, cambiando una o más propiedades térmicas del material polimérico 112. El líquido 124 puede fluir continuamente a través de la celda de flujo 122 durante la detección, o el flujo puede terminar antes de que comience la detección. La onda térmica 202 (Figura 2) y la onda térmica atenuada 204 pueden viajar a través del líquido 124 tanto si el líquido 124 fluye como si está estancado. Las propiedades térmicas del líquido 124 pueden diferir para los líquidos 124 que fluyen y los que están estancados, pero se pueden determinar en función de las propiedades del flujo. En algunas modalidades, la celda de flujo 122 y el líquido 124 que contiene pueden llevarse a una temperatura de prueba antes de la detección del analito 132. Como se discutió

anteriormente, el material polimérico 112 puede ser un polímero impreso molecularmente formulado para unirse a un analito particular 132 de interés.

La onda térmica 202 (FIG. 2) se proporciona desde el disipador de calor 114 al material polimérico 112 a través del sustrato 110. El controlador 121 (por ejemplo, un controlador PID) puede cambiar la temperatura del disipador de calor 114 a través del dispositivo de modificación de temperatura 118, por ejemplo, elevando y bajando la temperatura del disipador de calor 114 en una cantidad preseleccionada y en una frecuencia preseleccionada. El cambio en la temperatura del disipador de calor 114 puede ser lo suficientemente pequeño como para que el cambio no interfiera significativamente con otras mediciones que puedan ocurrir simultáneamente. Por ejemplo, la temperatura promedio del líquido 124 en la celda de flujo 122 se puede medir aunque la temperatura del disipador de calor 114 varíe, siempre que la escala de tiempo de la medición de la temperatura promedio sea más larga que la frecuencia de la variación y/o la cantidad de variación de temperatura es pequeña en comparación con el cambio de temperatura inducido por la interacción del analito 132 con el material polimérico 112. En algunas modalidades, el disipador de calor 114 puede proporcionar una onda térmica 202 que tiene una frecuencia de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,5 Hz, tal como de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,1 Hz, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05 Hz. Además, la frecuencia de la onda térmica 202 puede variar durante la prueba (por ejemplo, la frecuencia se puede variar continuamente de una frecuencia baja a una frecuencia alta o viceversa). La onda térmica 202 puede tener una amplitud de aproximadamente 1,0 °C o menos, aproximadamente 0,4 °C o menos, o incluso aproximadamente 0,10 °C o menos.

La temperatura del líquido 124 en la celda de flujo 122 puede probarse y el resultado puede compararse con la temperatura del disipador de calor 114.

La concentración del analito 132 en el líquido 124 se calcula al menos en parte sobre un cambio de fase entre la onda térmica 202 producida por el disipador de calor 114 y la onda térmica atenuada 204 en el líquido 124. El procesador 123 puede realizar una comparación de la onda térmica 202 y la onda térmica atenuada 204 basándose en las respuestas de los líquidos de concentración conocida. En algunas modalidades, la comparación de la onda térmica 202 con la onda térmica atenuada 204 puede basarse, al menos en parte, en las amplitudes, el cambio de fase u otra propiedad.

La medición de la onda térmica permite la medición de la resistencia térmica sin cambiar significativamente la temperatura general del material polimérico 112. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, tal medida parece ser un análogo térmico a la medida de capacitancia o inductancia en el campo de la electrónica. Por ejemplo, medir la resistencia revela cierta información sobre un dispositivo o material electrónico, pero medir la capacitancia o la impedancia revela información adicional, tal como la forma en que el dispositivo o el material responde a una carga. De manera similar, la medición de la resistencia térmica mediante los métodos descritos en la presente descripción puede revelar información adicional que la medición de una diferencia de temperatura en estado estacionario no puede revelar.

Por ejemplo, cuando se aplica una onda térmica, se dispone de diferentes tipos de información en forma de un cambio de amplitud, frecuencia y/o fase de la onda térmica atenuada en el líquido al unirse un objetivo al receptor. El cambio de fase puede variar según la frecuencia de la entrada. La cantidad de información proporcionada por una onda térmica es mucho mayor que el análisis de estado estacionario y la información puede permitir la detección o diferenciación de una variedad más amplia de materiales.

Además, y nuevamente sin estar ligado a ninguna teoría en particular, puede ocurrir un aumento en la masa térmica del material polimérico 112 al unirse el analito 132 a su receptor (es decir, las cavidades 136). Antes de la unión del analito 132, las cavidades 136 pueden rellenarse con líquido. Tras la unión del analito 132 a su receptor, el líquido puede ser reemplazado por el analito 132, aumentando así la masa térmica de todo el sistema transductor.

En algunas modalidades, el primer analito 132a se puede distinguir del segundo analito 132b al eliminar el segundo analito 132b del material polimérico 112. Por ejemplo, si el primer analito 132a son bacterias vivas y el segundo analito 132b son bacterias muertas, las bacterias muertas se pueden lavar o enjuagar del material polimérico 112 (por ejemplo, con un tampón), dejando atrás las bacterias vivas. Las diferencias de afinidad entre el primer analito 132a y el segundo analito 132b pueden facilitar tal discriminación. En algunas modalidades, el primer analito 132a puede ser la molécula molde usada para formar el material polimérico 112, y el segundo analito 132b puede ser una molécula o bacteria que tenga alguna funcionalidad similar. Por lo tanto, el segundo analito 132b puede unirse, al menos débilmente, al material polimérico 112.

## Ejemplos

Los ejemplos 1 a 5 se basan en aspectos de dispositivos biosensores descritos generalmente en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0011198 A1, "Heat-Transfer Resistance Based Analysis Bioparticles," publicada el 9 de enero de 2014. No forman parte de la presente invención, pero pueden usarse como conocimiento previo o junto con la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de MIP que tiene un molde para la detección de dopamina.

El dimetacrilato de etilenglicol (EGDM), el ácido metacrílico (MAA), la sal de clorhidrato de dopamina (99 %) y el metanol se adquirieron de Acros Organics (Loughborough, Reino Unido). Antes de la polimerización, los estabilizadores de MAA y EGDM se eliminaron por filtración sobre alúmina. El 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) y el monohidrato de sulfato de creatinina y serotonina (98 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido). Para las mediciones de transferencia de calor, se preparó una solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x con tabletas de Dulbecco obtenidas de Oxoid Limited (Basingstoke, Reino Unido).

Una mezcla de MAA (0,54 g, 6,6 mmol), EGDM (2,96 g, 14,9 mmol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (65 mg) se disolvió en metanol (3,67 ml) y agua (0,57 ml) junto con dopamina (0,063 g, 0,33 mmol), la molécula molde. Esta mezcla se desgasificó con N<sub>2</sub> y se calentó para iniciar la polimerización. Para permitir la terminación de la reacción, la mezcla se mantuvo a 65 °C durante 12 horas. Después de la polimerización, el polímero a granel se molió y tamizó para obtener micropartículas con diámetros inferiores a 10 µm. La dopamina se eliminó de los polvos MIP mediante extracción continua con una mezcla 50/50 de metanol y agua. Después de 6 horas, el MIP estaba sustancialmente libre de dopamina, según lo verificado por espectroscopía AT-IR con un NICOLET™ Dispositivo 380 FT-IR de Thermo Scientific (Loughborough, Reino Unido). Subsecuentemente, el polvo de MIP se secó en un horno durante 12 horas a 100 °C. Se sintetizó un polímero no impreso (NIP) como control de acuerdo con el mismo método, pero sin la presencia de la dopamina.

Ejemplo 2: Prueba de MIP para detectar dopamina

La especificidad y las isothermas de unión de las partículas MIP y NIP se determinaron mediante experimentos de reunión por lotes ópticos con un espectrofotómetro Agilent 8453 (Stockport, Reino Unido). Para los experimentos de reenlace, se añadieron 20 mg de polvo MIP o NIP a 5 ml de soluciones acuosas de dopamina en concentraciones entre 0,3 y 1,0 mM. Las suspensiones resultantes se agitaron durante 12 horas en una mesa oscilante a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las suspensiones se filtraron y la concentración libre de dopamina (C<sub>F</sub>) se determinó por espectroscopía UV-vis. Las concentraciones de dopamina unida (S<sub>b</sub>) se calcularon por gramo de MIP y NIP y las isothermas de unión, y se muestran en la figura 4. Ajustando las isothermas de unión, se determinó la especificidad de la MIP hacia la dopamina molde. Para probar la selectividad, se usó la molécula competidora serotonina, ya que su estructura es muy similar a la dopamina. Para estos experimentos, se añadieron 20 mg de polvo de MIP a 5 ml de soluciones acuosas de serotonina y se determinaron las isothermas de unión después de la filtración de las suspensiones.

La figura 4 muestra que existe una diferencia significativa en la unión entre el MIP y su referencia, el NIP. Para determinar la especificidad, se usó el factor de impresión (IF), que es la cantidad ligada al MIP dividida por la cantidad ligada al NIP de referencia en una concentración seleccionada. Las isothermas de unión se ajustaron con un ajuste de dos parámetros del siguiente tipo para analizar el factor de impresión en una concentración específica (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1: } S_b = A \cdot C_f^v$$

La ecuación 1 corresponde a la isoterma de Freundlich y puede usarse para el ajuste de las isothermas de unión a MIP si se supone que la distribución de los sitios de unión y las constantes de afinidad son heterogéneas. A C<sub>f</sub> = 0,3 mM, el IF fue de 3,1 ± 0,1, mientras que concentraciones más altas produjeron valores de IF ligeramente inferiores (-2,5) debido a la saturación de los sitios de unión. Los resultados fueron comparables a otros MIP de dopamina en la literatura. La respuesta del MIP al competidor serotonina no fue significativamente diferente a la de referencia, lo que demuestra la selectividad del sistema.

Ejemplo 3: Preparación de electrodos serigrafados (SPE) recubiertos con MIP

Los experimentos realizados a lo largo de los siguientes ejemplos usan electrodos serigrafados (SPE) (41 mm x 7 mm), que comprenden una configuración de tres electrodos con un electrodo de trabajo de grafito de 3 mm, un contraelectrodo de grafito y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Los SPE se fabricaron con diseños de plantilla para formar un electrodo de trabajo de 3 mm de diámetro, mediante el uso de una máquina de serigrafía (MicroDEK 1760RS, comercializado por DEK, Weymouth, Reino Unido). En primer lugar, se imprimió una formulación de tinta de grafito de carbono (C2000802P2, comercializado por Gwent Electronic Materials Ltd, Reino Unido) en un sustrato de poliéster que tenía un grosor de 250 µm. La tinta de carbón-grafito se curó en un horno con ventilador a 60 °C durante 30 minutos. Se imprimió una pasta dieléctrica (D2070423D5, comercializado por Gwent Electronic Materials Ltd) sobre el sustrato de poliéster para el recubrimiento de las conexiones. La pasta dieléctrica se curó a 60 °C durante 30 minutos. Se encontró que la reproducibilidad de este lote de sensores corresponde a menos del 4 % RSD hacia una sonda redox, [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+/3+</sup>/0,1 M KCl, mediante el uso de un conector de borde.

Los MIP se incorporaron a la tinta de los SPE sobre la base del por ciento en peso de  $M_P$  y  $M_I$ , donde  $M_P$  es la masa de partículas y  $M_I$  es la masa de la formulación de tinta usada en el proceso de impresión. A los efectos de estos ejemplos, el por ciento en peso de  $M_P$  fue 30 % y el por ciento en peso de  $M_I$  fue del 70 %.

Ejemplo 4: Medidas de voltamperometría cíclica de SPE

Las medidas voltamperométricas cíclicas se llevaron a cabo mediante el uso de un potenciostato (Autolab PG-STAT, comercializado por Metrohm, Utrecht, Países Bajos), mediante el uso de tres electrodos. Como electrodos de trabajo definidos se usaron electrodos serigrafiados con grafito y SPE revestidos con MIP como se describió en el ejemplo 3. Un contador de platino y un electrodo de calomelano saturado (SCE) como electrodo de referencia completan el circuito. Este protocolo electroanalítico se estudió en un intervalo de concentraciones de dopamina de 0 a 50  $\mu\text{M}$ , en etapas de 5  $\mu\text{M}$ , dentro de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH-7,4 desgasificada con nitrógeno. El pico de oxidación a +0,20 V se usó como parámetro analítico. Este procedimiento experimental se llevó a cabo en el intervalo de potencial de -0,2 V a +0,8 V a una velocidad de exploración de 50 mV/s. Las curvas de calibración resultantes se muestran en la figura 5. El análisis de la altura del pico de oxidación frente a la concentración de dopamina muestra que la respuesta en ambos electrodos fue aproximadamente lineal.

La respuesta de ambos electrodos a la dopamina se puede representar con un ajuste lineal ( $R^2= 0,97$ ), indicando el régimen sensible de la plataforma del sensor. Para los SPE desnudos, el gradiente fue de 0,023  $\mu\text{A}/\mu\text{M}$  de dopamina, mientras que para el SPE modificado con MIP el gradiente fue de 0,025  $\mu\text{A}/\mu\text{M}$  de dopamina. El límite de detección se definió como la concentración a la que la señal es tres veces la desviación estándar. El límite de detección fue de  $4,7 \pm 0,05 \mu\text{M}$  para el SPE recubierto con MIP y de  $4,0 \pm 0,06 \mu\text{M}$  para el SPE desnudo.

Ejemplo 5: Método de transferencia de calor (HTM)

Se fabricó una celda de flujo con un diámetro interior de 6 mm y una altura de 4 mm, con un volumen interior total de 110  $\mu\text{l}$ , de acrílico (disponible bajo la marca comercial PERSPEX®, de Lucite International, de Lancashire, Reino Unido). La celda de flujo se acopló al sistema de potenciostato descrito en el ejemplo 4 y se selló con un anillo O. El área de contacto entre la celda de flujo y el sistema de potenciostato fue de 28  $\text{mm}^2$ . Los SPE revestidos con MIP (descritos en el ejemplo 3) se montaron horizontalmente y se presionaron mecánicamente sobre un bloque de cobre, que sirvió como disipador de calor. La temperatura  $t_1$  del bloque de cobre fue controlada activamente por un controlador proporcional integral derivado (PID) con parámetros de control  $P = 8$ ,  $I = 1$  y  $D = 0$ , y medido por un termopar. La temperatura  $t_1$  del bloque de cobre se mantuvo a 37,00 °C.

Se colocó un segundo termopar sobre la superficie de los SPE recubiertos con MIP, que midió la temperatura  $T_2$  en el líquido. La resistencia térmica, abreviada como  $R_{th}$  (°C/W), se determinó dividiendo la diferencia de temperatura ( $T_1-T_2$ ) por la potencia de entrada  $P$  (en Watts) consumida manteniendo la temperatura constante a 37,00 °C (Ecuación 2).

$$\text{Ecuación 2: } R_{th} = \frac{T_1 - T_2}{P}$$

Los SPE recubiertos con MIP se estabilizaron en soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS), y luego se agregaron a la celda de flujo concentraciones crecientes de dopamina (0 a 900 nM) en la solución. Después de la estabilización de la señal, se determinaron los valores de  $R_{th}$  a cada concentración. Se construyeron las curvas dosis-respuesta correspondientes y se muestran en la figura 4.

La celda de flujo se colocó en un entorno con una temperatura ambiente estable de  $20,00 \pm 0,02$  °C. La temperatura del bloque de cobre,  $T_1$ , fue estrictamente controlada a  $37,00 \pm 0,02$  °C por un controlador PID. La celda de flujo se llenó con una solución de PBS pura; después de la estabilización de  $T_2$ , se añadieron concentraciones crecientes de dopamina en soluciones de PBS (0 a 1000 nM). Como se muestra en la figura 6, un cambio en la concentración de la solución que fluye hacia la celda de flujo resultó en una caída rápida en  $T_2$ . Después de alcanzar un nivel de meseta estable, la celda del sensor se dejó estabilizar durante al menos 15 minutos. La disminución de  $T_2$  entonces puede atribuirse únicamente a la unión de las moléculas diana a la capa MIP. La figura 7 muestra los valores de resistencia térmica en función del tiempo, y la figura 8 muestra los correspondientes datos de  $R_{th}$  en forma de una curva dosis-respuesta. Los valores normalizados mostrados en la figura 8 se calcularon dividiendo  $R_{th}$  observada después de cada adición a la señal de la línea de base.

La figura 7 ilustra que  $R_{th}$  de la resistencia térmica aumentó gradualmente de  $6,80 \pm 0,10$  °C/W a  $7,92 \pm 0,09$  °C/W aumentando gradualmente la concentración de dopamina a 900 nM en PBS. Esto corresponde a un aumento porcentual del 16,5 %, significativamente superior a la señal/ruido (1,1 %), lo que indica que el efecto se debe a la unión del objetivo a las nanocavidades del MIP. Cuando se realizó la misma prueba en el electrodo NIP de referencia, la resistencia térmica no cambió significativamente con concentraciones crecientes de dopamina. Por lo tanto, el MIP parece ser específico de la dopamina.

Como se muestra en la curva dosis-respuesta calculada en la figura 8; a concentraciones de hasta 800 nM, el efecto de unión aumentó linealmente con la concentración. A concentraciones más altas, se mostró una tendencia hacia la

saturación, que puede atribuirse a una mayor ocupación de los sitios de unión. Con un ajuste lineal, se determinó que el límite de detección era  $350 \pm 30$  nM, que es una mejora significativa en comparación con la voltametría cíclica (que tiene un límite de detección de  $4700 \pm 50$  nM, véase el ejemplo 4).

#### 5 Ejemplo 6: Análisis de transporte de ondas térmicas (TWTA)

Además de analizar el transporte de calor a través del chip funcionalizado, el cambio de fase en respuesta al disipador de calor se estudió simultáneamente en la misma muestra en la que se realizó el HTM (Ejemplo 5).

10 A cuatro concentraciones de dopamina elegidas en PBS (0, 300 nM, 400 nM y 800 nM), el controlador PID transmitió una onda térmica a través del disipador de calor mediante una resistencia de alta potencia con conductores radiales de  $22 \Omega$  (serie tipo MPR, comercializado por TE Connectivity, de Schaffhausen, Suiza) a través de una pasta de silicona de conductor térmico (SILCOTHERM SG502, comercializado por ACC Silicones Ltd., de Somerset, Reino Unido). La onda térmica tenía una amplitud de  $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  y una frecuencia variable de  $0,01 \text{ Hz}$  a  $0,05 \text{ Hz}$ , como se muestra en la figura 9. Cuando la dopamina se unió a las partículas MIP, un retraso en la fase ( $\phi_1 \neq \phi_2$ ) y una reducción de la amplitud ( $\alpha_1 \neq \alpha_2$ ) de la salida de la onda térmica se midieron en  $T_2$ , como se muestra en la figura 10. Debido a que la onda térmica tenía una amplitud de solo  $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  y se aplicó en no más de cuatro puntos distintos en el tiempo, la onda térmica no afectó la estabilidad del sistema ni los valores de resistencia térmica calculados.

20 En la figura 10, el cambio de fase observado entre la onda térmica de entrada ( $T_1$ ) y la onda resultante que pasa a través del SPE recubierto con MIP expuesto a una solución tampón de PBS puro se debió al tiempo necesario para transferir calor desde el disipador de calor hasta el centro del compartimento de líquido. Se observó un ligero aumento del cambio de fase, acompañado de una disminución de la amplitud de la señal, cuando el SPE recubierto con MIP se expuso a una solución  $300 \text{ nM}$  de dopamina en PBS. Con concentraciones más altas de dopamina, el cambio de fase medido aumentó más y la amplitud disminuyó más. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, parece que la unión del neurotransmisor a la capa MIP dio como resultado un aumento en la resistencia a la transferencia de calor en la interfaz sólido-líquido. Esto conduce a una disipación más lenta del calor del disipador de calor al compartimento de líquido y parece explicar los resultados observados en la figura 10.

30 La figura 11 muestra la fase observada en función de la frecuencia de la onda térmica aplicada. Como se muestra en la figura 11, aparece un gran cambio en el cambio de fase entre  $0,02 \text{ Hz}$  y  $0,03 \text{ Hz}$ , con cambios más pequeños entre  $0 \text{ Hz}$  y  $0,02 \text{ Hz}$  y entre  $0,03 \text{ Hz}$  y  $0,05 \text{ Hz}$ . Por lo tanto, se seleccionó una frecuencia de  $0,03 \text{ Hz}$  para medir la dinámica del receptor objetivo en los ejemplos posteriores. A concentraciones superiores a  $300 \text{ nM}$ , se midió un efecto significativo en la salida de onda térmica a  $0,03 \text{ Hz}$ . A esta frecuencia, se observó un cambio de fase de  $-57^\circ \pm 1^\circ$  en PBS, mientras que a  $800 \text{ nM}$  aumentó a  $-75^\circ \pm 2^\circ$ , lo que corresponde a un aumento porcentual del  $31 \% \pm 2 \%$ .

40 Como se muestra en la figura 8, el límite de detección de dopamina por el método de transferencia de calor (HTM, ejemplo 5) fue de aproximadamente  $350 \text{ nM}$ . Sin embargo, midiendo la respuesta de cambio de fase, como se describió en el ejemplo 6, la dopamina se midió con éxito a  $300 \text{ nM}$ . A una concentración mayor de  $800 \text{ nM}$ , el método de transferencia de calor produjo un efecto de  $16 \pm 1 \%$ , que es casi un factor de dos menor que para la respuesta de cambio de fase. Por lo tanto, el análisis de transferencia de ondas térmicas (TWTA, ejemplo 6) puede mejorar la detección de dopamina.

#### 45 Ejemplo 7: Detección de dopamina en plátanos

Los plátanos se molieron durante  $4 \text{ min}$  en una batidora y vaporizador combinados (Avent modelo SCF870/20, comercializado por Royal Philips, de Eindhoven, Países Bajos) y subsecuentemente se centrifugaron a  $3200 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ minutos}$ . El sobrenadante se filtró para obtener un líquido transparente, que se enriqueció con concentraciones crecientes de dopamina ( $62,5$ ,  $125$ ,  $250$ ,  $500$ ,  $1000$ ,  $2000 \text{ nM}$ ). A concentraciones de  $500 \text{ nM}$  y superiores, se observó un efecto significativo sobre la resistencia térmica.

55 Se repitió la prueba descrita en el ejemplo 6 mediante el uso del líquido derivado de plátano enriquecido con dopamina. El resultado de las salidas de ondas térmicas normalizadas a la temperatura inicial de  $37,00 \text{ }^\circ\text{C}$  y los correspondientes desplazamientos de fase se muestran en la figura 12. Solo se proporcionan los resultados para  $500 \text{ nM}$  y concentraciones más altas porque a concentraciones más bajas no se observaron diferencias significativas. Se aplicó un filtro suave (mediana de  $10$  puntos) a los datos para corregir los efectos de la viscosidad. La figura 13 muestra la fase observada en función de la frecuencia de la onda térmica aplicada. A la concentración enriquecida de  $500 \text{ nM}$ , se midió un cambio de fase de  $-55 \pm 3 \text{ Hz}$  en comparación con  $37 \pm 2 \text{ Hz}$  en una solución pura sin enriquecimiento. En aumento porcentual se midió una diferencia de  $46 \% \pm 2 \%$ , que es una combinación del efecto de la concentración de dopamina enriquecida y de la dopamina inicial presente en la banana. Debido a que  $500 \text{ nM}$  todavía está en el intervalo de concentración en el que la dopamina está presente en muestras biológicas, este ejemplo 7 muestra que la técnica de análisis de transferencia de onda térmica (TWTA) puede usarse para medir concentraciones de dopamina biológicamente relevantes.

65

Los métodos convencionales son difíciles de implementar para medir muestras relacionadas con alimentos debido a la alta viscosidad y la presencia de otros compuestos que interfieren en las muestras de alimentos, como proteínas grandes. Por ejemplo, el límite de detección de ciertos compuestos puede aumentar debido a la unión no específica y niveles de ruido más altos (compare el ejemplo 6, en donde se detectaron concentraciones de 300 nM en el tampón, con el ejemplo 7, en donde se detectaron concentraciones de 500 nM en el líquido de plátano).

La tabla 1 más abajo compara los límites de detección para los SPE de dopamina modificados con MIP en soluciones tampón y en una muestra de alimentos. La tabla 1 muestra que los métodos térmicos pueden proporcionar ventajas sobre los métodos electroquímicos convencionales porque el límite de detección en soluciones tampón es aproximadamente un orden de magnitud menor. Además, los métodos térmicos permiten la medición de muestras de alimentos complejas. En comparación con HTM, el análisis del transporte de ondas térmicas tuvo un tamaño de efecto significativamente mayor (31 % frente a 16 % a 800 nM en soluciones tampón de dopamina) y mejoró el límite de detección al requerir un control de temperatura menos estricto.

Tabla 1: Límites de detección de SPE de dopamina modificados con MIP

Técnica de detección	Límite de detección de soluciones tampón (nM)	Límite de detección de muestras de alimentos enriquecidas con dopamina (nM)
Voltametría cíclica	4700 ± 50 (Ejemplo 4)	-
Método de transferencia de calor (HTM)	350 ± 30 (Ejemplo 5)	-500 nM (Ejemplo 7)
Análisis de transporte de ondas térmicas (TWTA)	300 ± 35 (Ejemplo 6)	-500 nM (Ejemplo 7)

La mezcla directa de partículas de MIP con tinta de serigrafía puede eliminar algunas etapas en la preparación de electrodos y puede permitir la producción en masa de electrodos funcionalizados. El análisis de transporte de ondas térmicas (TWTA) puede generar límites de detección de dopamina en el régimen nanomolar no solo para soluciones tampón, sino también con una muestra de alimentos relevante. Un beneficio adicional es que esta técnica se puede realizar simultáneamente con el método de transferencia de calor, lo que permite la validación directa de los resultados. La metodología descrita ofrece un nuevo enfoque para la detección rápida y rentable de neurotransmisores, que puede usarse en los campos de la investigación biomédica y clínica.

Los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción pueden usarse junto con técnicas de análisis de ondas térmicas o de estado estacionario. Pueden usarse varias formas de sustratos y los datos (por ejemplo, la temperatura) se pueden recopilar en varios puntos, tal como en el líquido a analizar, en un sustrato revestido con material polimérico o en un termopar revestido.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para proporcionar una caracterización de bacterias en tiempo real o casi en tiempo real que se realiza convencionalmente en laboratorios que tienen equipos complejos y personal altamente capacitado. Por lo tanto, los métodos y dispositivos pueden permitir una recogida de datos más rápida y económica, y pueden permitir mejores resultados, por ejemplo, identificando brotes bacterianos dentro de una población. Los métodos pueden ser beneficiosos en el cuidado de la salud, la seguridad ambiental y alimentaria (por ejemplo, mediante la detección de bacterias transmitidas por el agua, el aire y los alimentos) y la lucha contra el terrorismo (por ejemplo, al detectar ántrax, etc.).

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (100) para detectar un analito (132), el dispositivo comprende:

5 un sustrato (110) que tiene un material polimérico (112) formado en una superficie del mismo, el material polimérico formulado para unirse al analito, en donde una propiedad de transferencia de calor del material polimérico se formula para variar en función de la cantidad del analito unido al mismo; un elemento de transferencia de calor (114) acoplado térmicamente a una superficie del sustrato opuesta al material polimérico;

10 un dispositivo de modificación de temperatura (118) acoplado térmicamente al elemento de transferencia de calor; caracterizado además por un controlador (121) configurado para hacer que el dispositivo de modificación de temperatura produzca una onda térmica (202) que emana del elemento de transferencia de calor; una celda de flujo (122) localizada y configurada para pasar un líquido (124) sobre el material polimérico del sustrato;

15 un sensor de temperatura (134) configurado para detectar una temperatura ( $T_2$ ) del líquido que pasa sobre el material polimérico; y un procesador (123) configurado para calcular una concentración de un analito (132) en el líquido basado al menos en parte en un cambio de fase entre la onda térmica en el elemento de transferencia de calor y una onda térmica atenuada (204) en el líquido.

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el procesador (123) se configura para calcular la concentración del analito basándose, al menos en parte, en una diferencia de amplitud entre la onda térmica en el elemento de transferencia de calor (114) y la onda térmica atenuada en el líquido (124).

25 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el controlador (123) se configura para cambiar una temperatura del elemento de transferencia de calor (114) a una frecuencia variable.

30 4. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el material polimérico (112) comprende un polímero impreso, tal como un polímero impreso molecularmente o un polímero impreso en la superficie.

5. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el material polimérico (112) comprende un material seleccionado del grupo que consiste en ADN, ARN, proteínas y porciones y análogos de los mismos.

35 6. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el material polimérico (112) está formulado para unirse a una primera bacteria con una primera afinidad mayor que una segunda afinidad del material polimérico a una segunda bacteria.

40 7. El dispositivo de la reivindicación 6, en donde la primera bacteria comprende bacterias vivas, y en donde la segunda bacteria comprende bacterias muertas, las bacterias vivas y las bacterias muertas son de la misma especie o en donde la primera bacteria comprende una primera especie, y en donde la segunda bacteria comprende una segunda especie, la segunda especie es un análogo de la primera especie.

45 8. Un método para detectar un analito, el método comprende:

pasar un líquido (124) que contiene un analito (132) sobre un material polimérico (112) en un sustrato (110), el material polimérico formulado para unirse al analito, en donde se formula una propiedad de transferencia de calor del material polimérico para variar en función de una cantidad del analito unido al mismo; unir el analito al material polimérico; caracterizado además por las etapas de

50 proporcionar una onda térmica (202) desde un elemento de transferencia de calor (114) al material polimérico a través del sustrato; detectar una temperatura ( $T_2$ ) del líquido; y calcular una concentración del analito en el líquido basándose al menos en parte en un cambio de fase entre la onda térmica producida por el elemento de transferencia de calor y una onda térmica atenuada (204) en el líquido.

55

9. El método de la reivindicación 8, que comprende además generar la onda térmica con un controlador (121) configurado para cambiar una temperatura ( $T_1$ ) de un dispositivo de modificación de temperatura (118) acoplado térmicamente al elemento de transferencia de calor.

60 10. El método de la reivindicación 8, en donde calcular una concentración del analito (132) en el líquido (124) comprende determinar una diferencia de amplitud entre la onda térmica en el elemento de transferencia de calor (114) y la onda térmica atenuada en el líquido (124).

65

11. El método de la reivindicación 8, en donde proporcionar una onda térmica desde un elemento de transferencia de calor (114) al material polimérico (112) a través del sustrato (110) comprende cambiar la frecuencia de la onda térmica.
- 5 12. El método de la reivindicación 8, en donde detectar una temperatura del líquido (124) comprende detectar la temperatura del líquido en función del tiempo.
13. El método de la reivindicación 8, en donde calcular una concentración del analito (132) en el líquido (124) comprende calcular una concentración de un analito biológico en el líquido.
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en donde calcular una concentración de un analito biológico en el líquido (124) comprende calcular una concentración de histamina en el líquido.
- 15 15. El método de la reivindicación 8, en donde pasar un líquido (124) que contiene un analito (132) sobre un material polimérico (112) en un sustrato (110) comprende pasar el líquido que contiene el analito sobre un polímero impreso molecularmente o en donde pasar un el líquido que contiene un analito sobre un material polimérico en un sustrato comprende pasar el líquido que contiene el analito sobre un material seleccionado del grupo que consiste en ADN, ARN, proteínas y porciones y análogos de los mismos.
- 20 16. El método de la reivindicación 8, en donde proporcionar una onda térmica desde un elemento de transferencia de calor (114) al material polimérico (112) a través del sustrato (110) comprende cambiar una temperatura ( $T_1$ ) del elemento de transferencia de calor (114) en menos de 0,2 °C.
- 25 17. El método de la reivindicación 8, en donde calcular una concentración del analito (132) en el líquido (124) comprende calcular una concentración de bacterias en una mezcla que comprende una pluralidad de especies.
18. El método de la reivindicación 8, en donde calcular una concentración del analito (132) en el líquido (124) comprende calcular una concentración de bacterias vivas en una mezcla que comprende bacterias vivas y muertas de la misma especie.
- 30 19. El método de la reivindicación 8, que comprende además lavar el material polimérico (112) para eliminar del mismo material distinto del analito.
- 35 20. Un método para formar un dispositivo (100) para detectar un analito (132) como se define en una cualquiera o más de las reivindicaciones 1-7, el método comprende:
- 40 formar un material polimérico (112) sobre una superficie de un sustrato (110), el material polimérico formulado para unirse al analito, en donde una propiedad de transferencia de calor del material polimérico se formula para variar en función de una cantidad del analito unido al mismo;
- 45 acoplar térmicamente un elemento de transferencia de calor (114) a una superficie del sustrato opuesta al material polimérico;
- acoplar térmicamente un dispositivo de modificación de temperatura (118) al elemento de transferencia de calor; caracterizado además por las etapas de
- 50 configurar un controlador (120) para hacer que el dispositivo de modificación de temperatura produzca una onda térmica (202) que emana del elemento de transferencia de calor;
- configurar una celda de flujo (122) para pasar un líquido (124) sobre el material polimérico del sustrato;
- configurar un sensor de temperatura (134) para detectar una temperatura ( $T_2$ ) del líquido que pasa sobre el material polimérico; y
- configurar un procesador (123) para calcular una concentración de un analito (132) en el líquido basado al menos en parte en un cambio de fase entre la onda térmica en el elemento de transferencia de calor y una onda térmica atenuada (204) en el líquido.
21. El método de la reivindicación 20, en donde formar un material polimérico (112) sobre una superficie de un sustrato (110) comprende serigrafar el material polimérico sobre la superficie del sustrato o en donde formar un material polimérico sobre una superficie de un sustrato comprende formar un polímero impreso molecularmente sobre la superficie del sustrato.
- 55

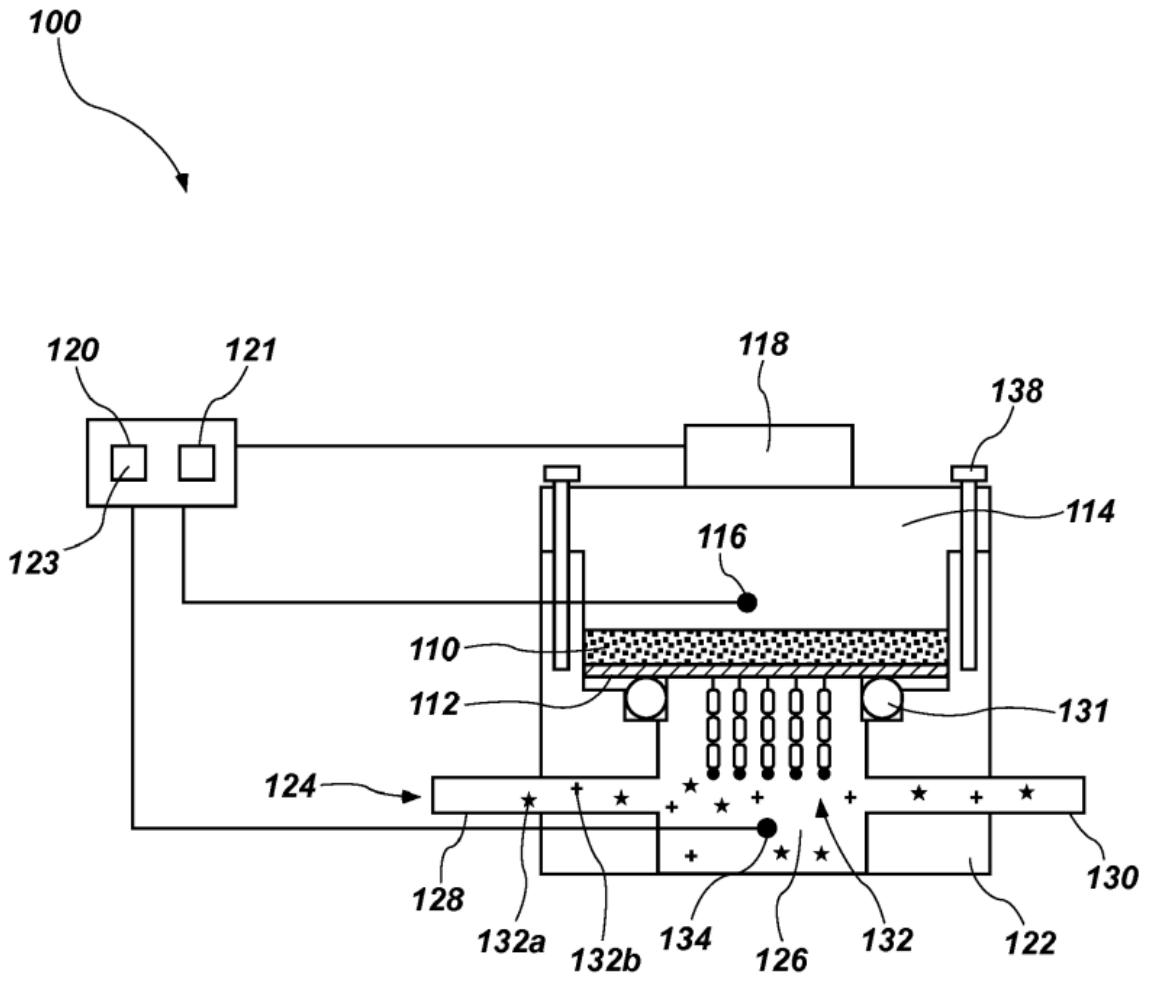
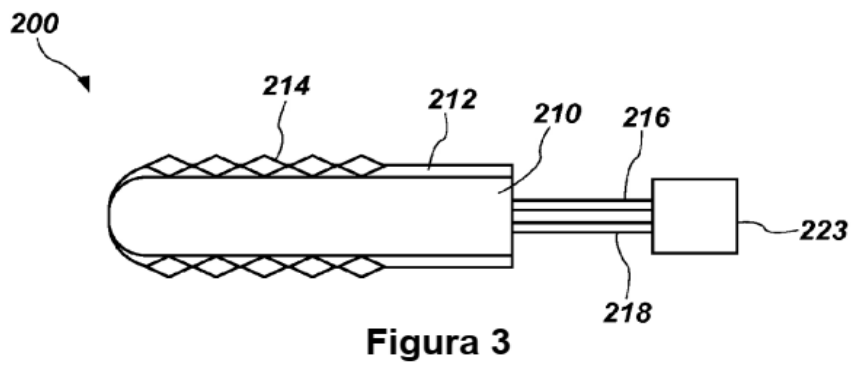
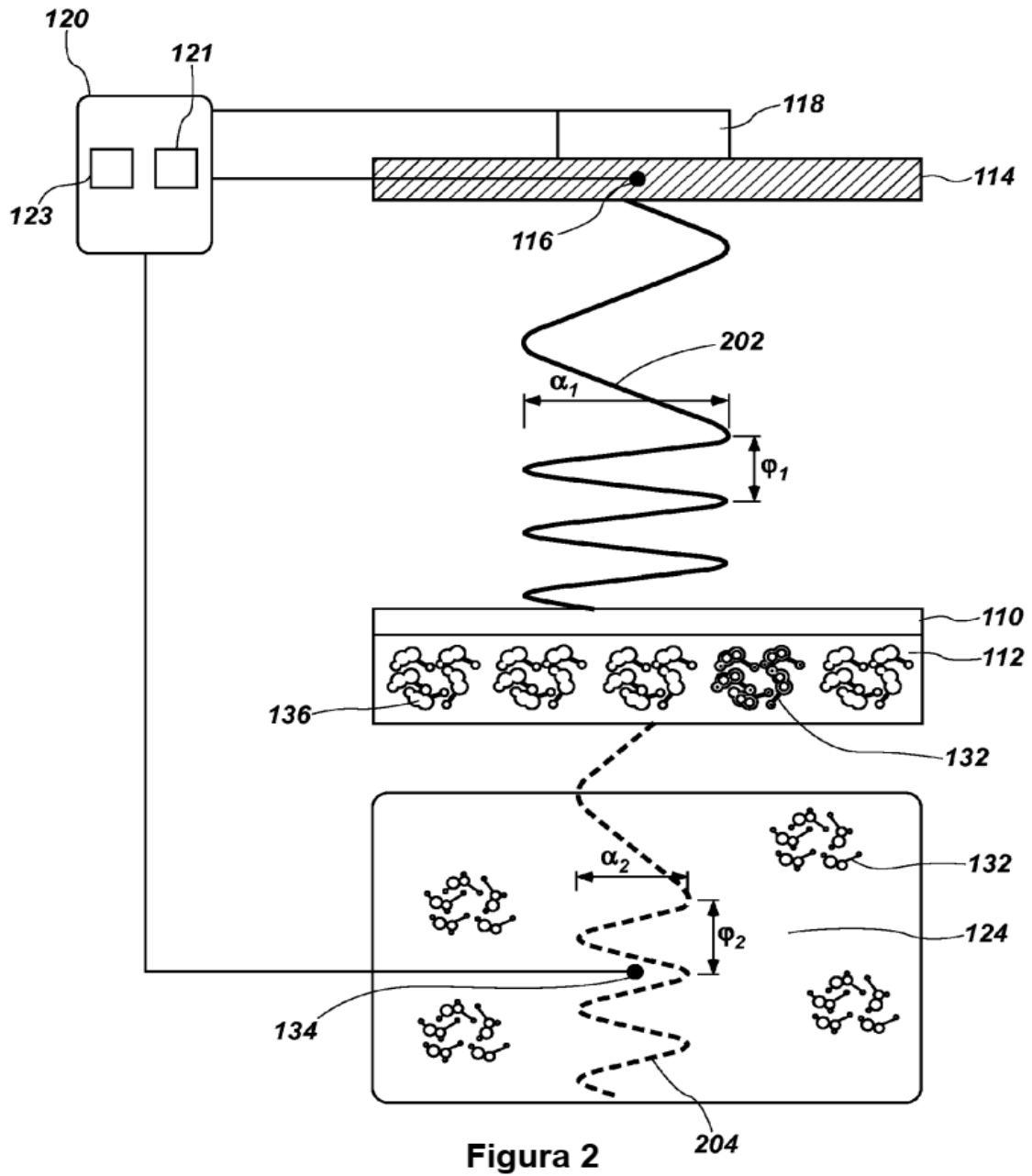


Figura 1



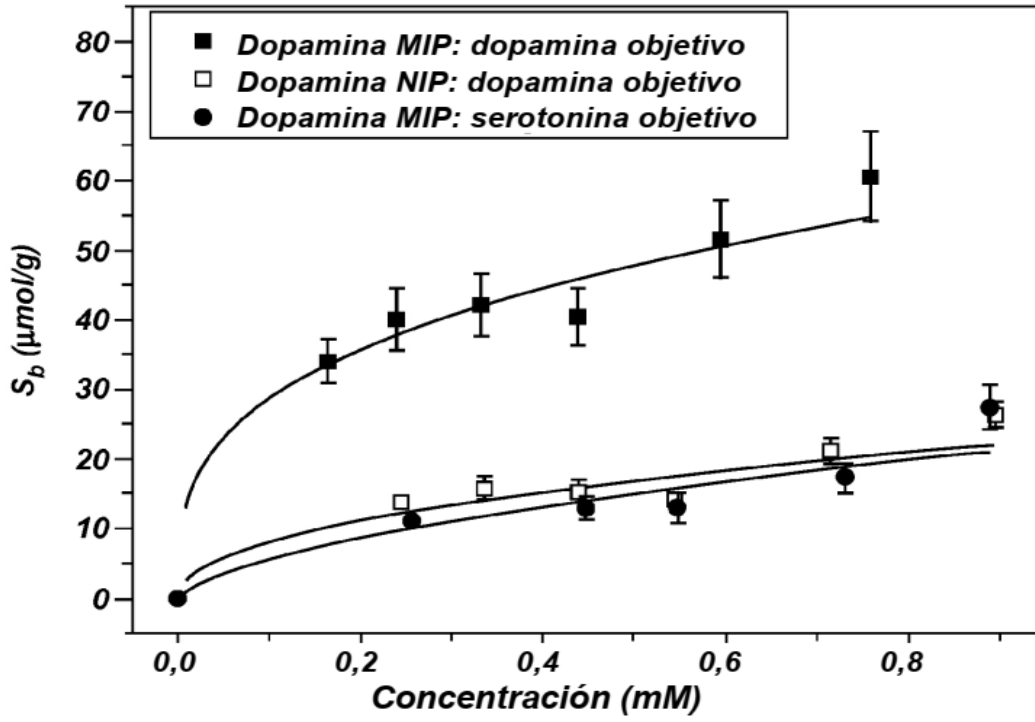


Figura 4

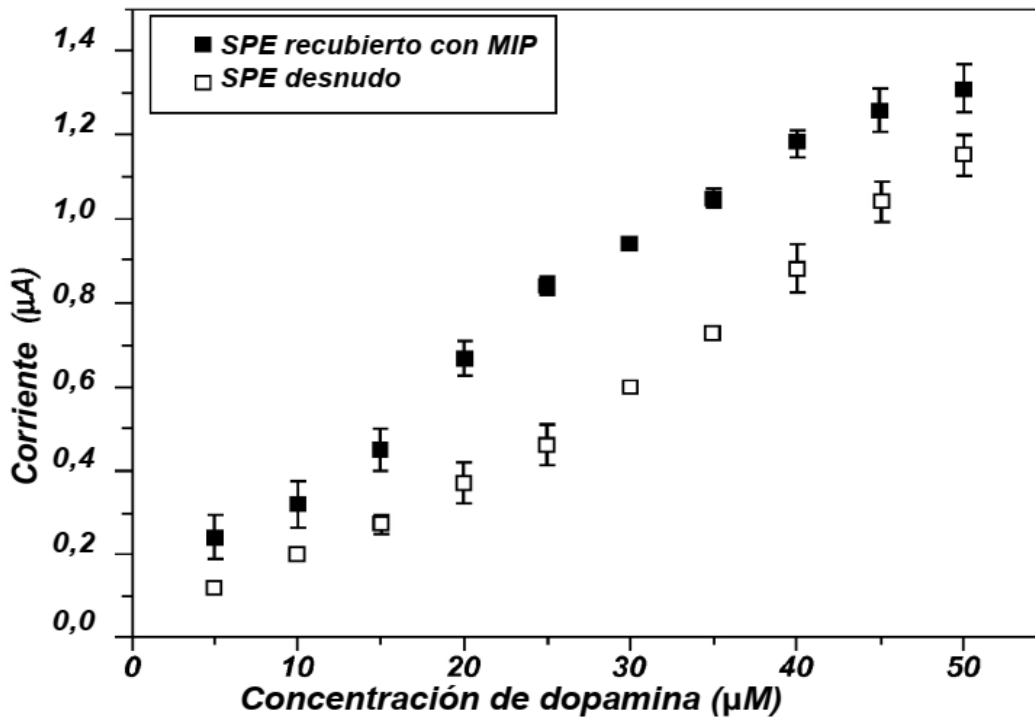


Figura 5

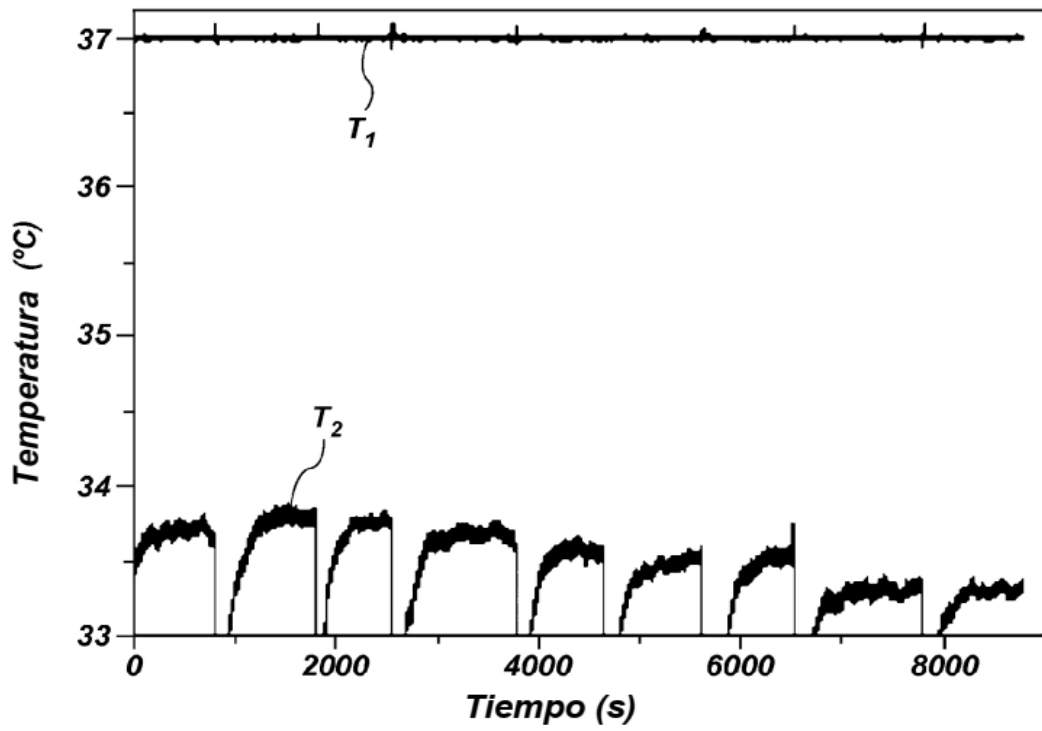


Figura 6

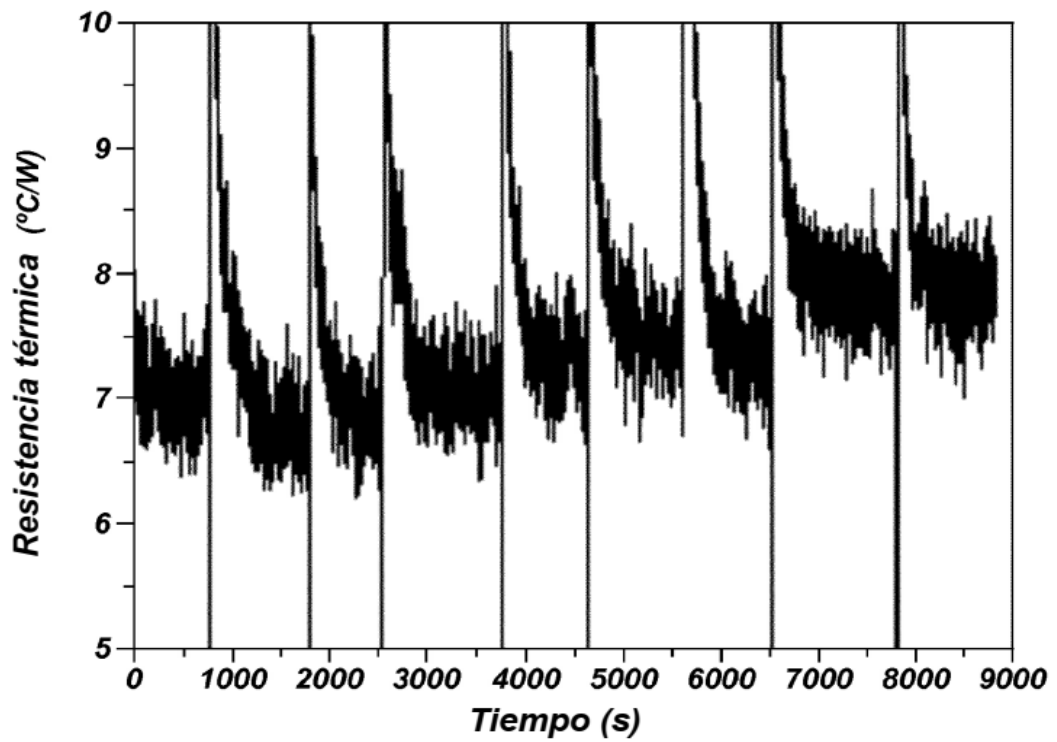


Figura 7

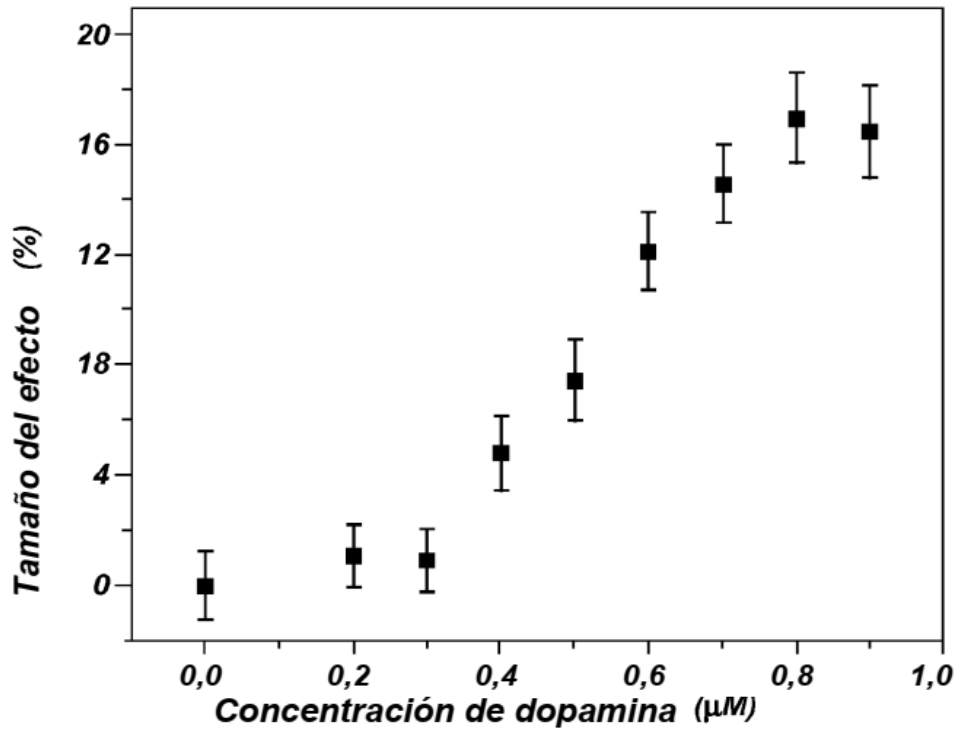


Figura 8

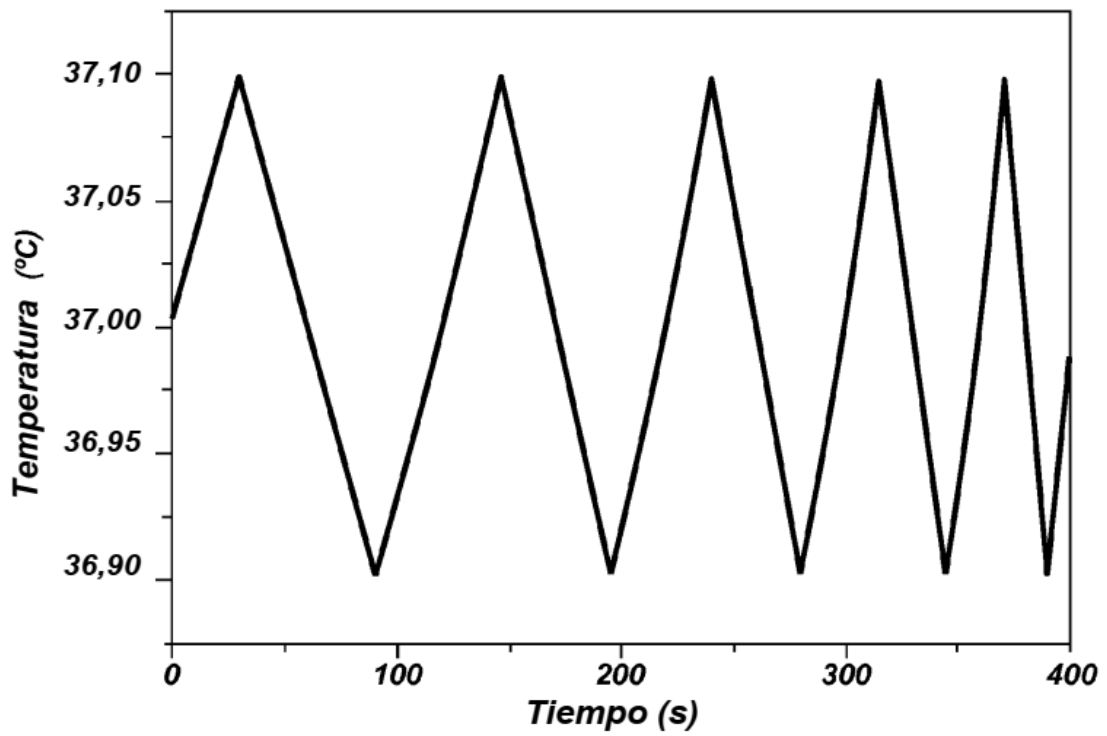


Figura 9

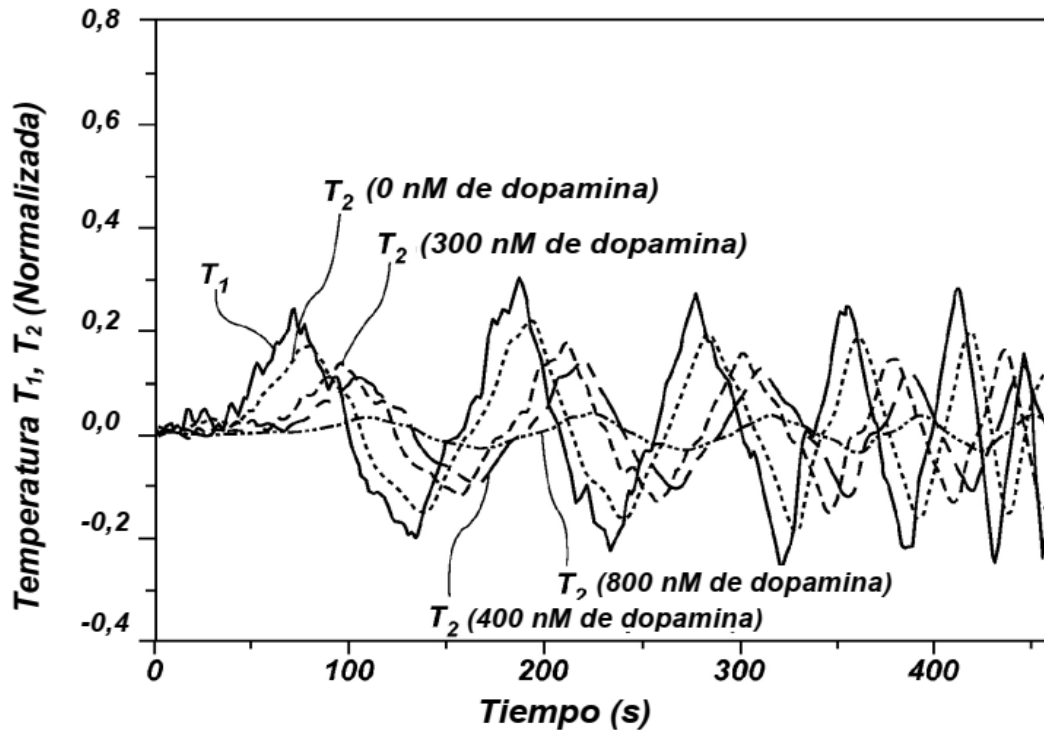


Figura 10

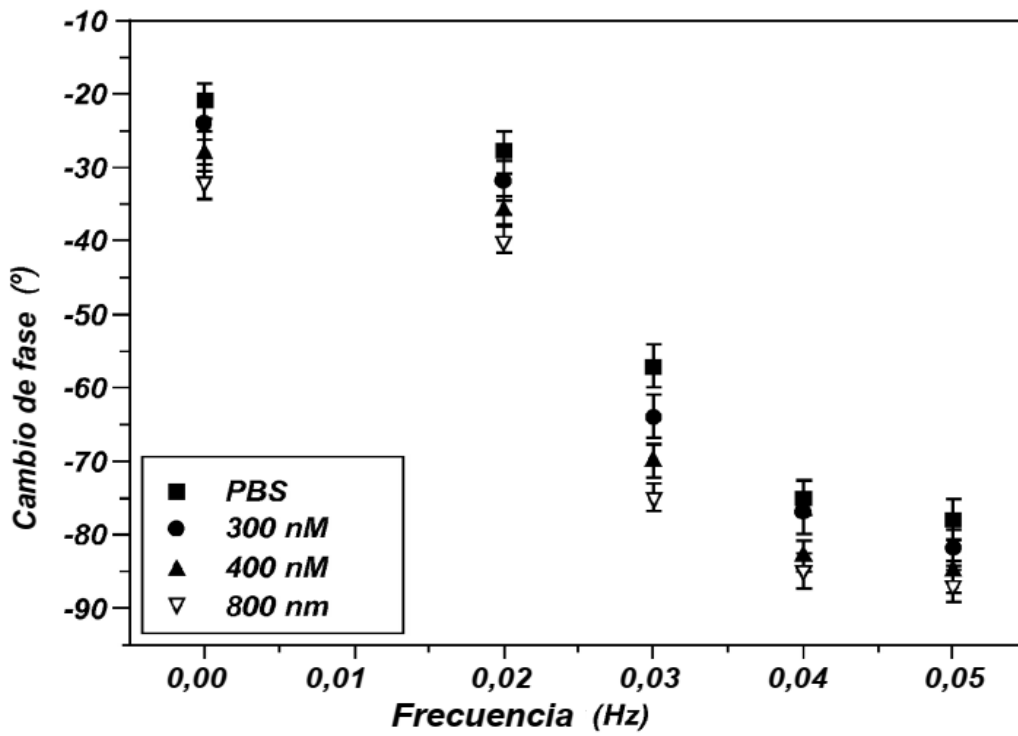


Figura 11

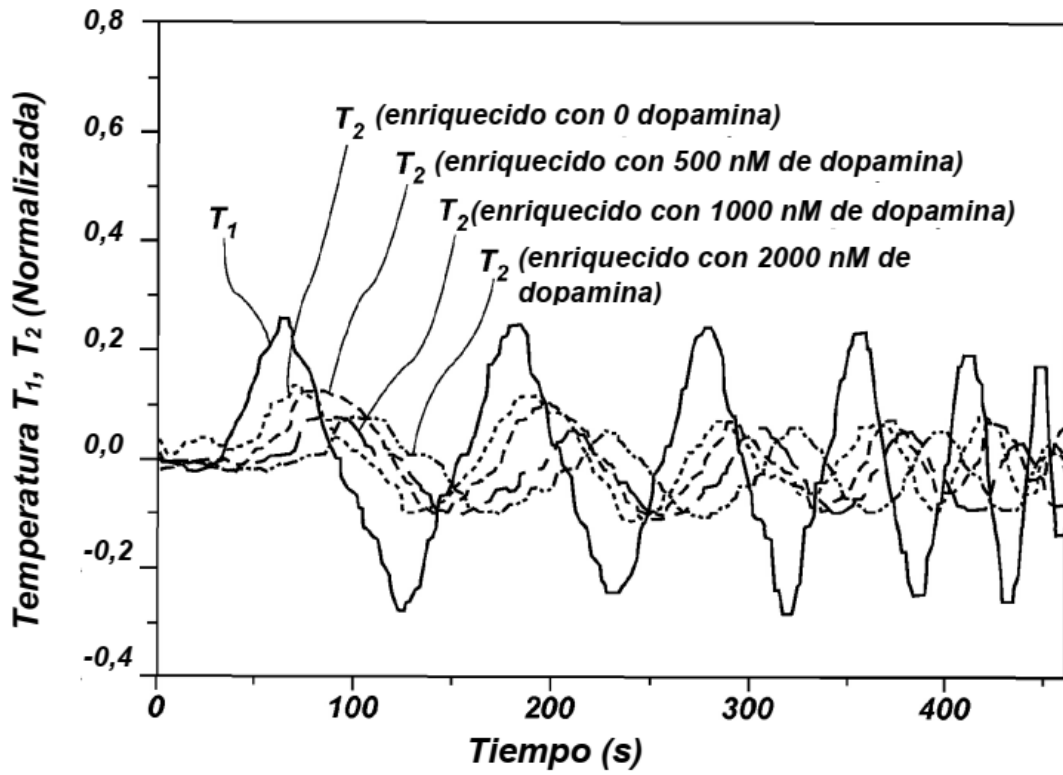


Figura 12

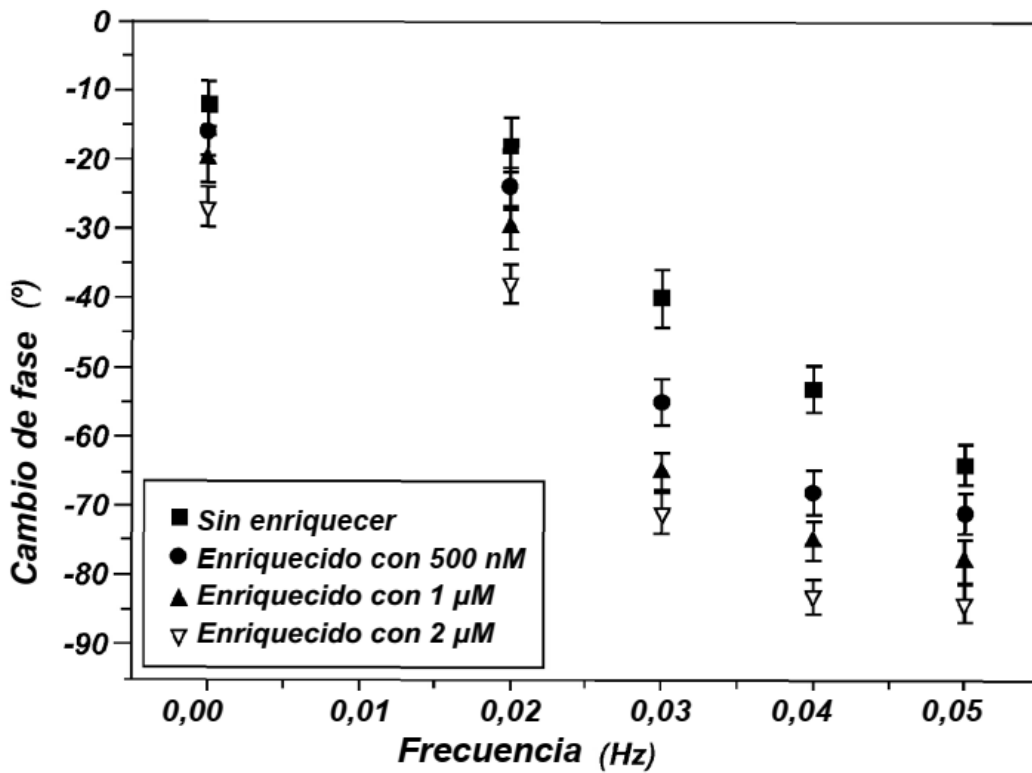


Figura 13