



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 304 076**

⑫ Número de solicitud: 200503231

⑬ Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **29.12.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2008**

Fecha de la concesión: **19.06.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **06.07.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
06.07.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Zaragoza**
c/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza, ES

⑳ Inventor/es: **Galbán Bernal, Javier;**
Marcos Ruiz, Susana de;
Sanz Beltrán, Vanesa y
Sanz Vicente, Isabel

㉑ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

㉒ Título: **Célula de flujo con lámina sensora para determinaciones analíticas.**

㉓ Resumen:

Célula de flujo con lámina sensora para determinaciones analíticas.

La presente invención se refiere a célula de flujo para determinaciones analíticas, especialmente mediante técnicas analíticas de absorción y/o fluorescencia molecular, caracterizada porque comprende cuatro placas superpuestas y unidas entre sí, de las cuales al menos las tres superiores disponen de otras tantas aberturas enfrentadas; una junta tórica de estanquidad dispuesta entre cada dos placas consecutivas, alrededor de la abertura central; al menos una ventana de cuarzo transparente montada entre las dos placas superiores, en coincidencia con la abertura central de las mismas; y una lámina sensora montada entre las dos placas inferiores, en coincidencia con la abertura central; disponiendo además las dos placas superiores de dos orificios pasantes cada una, situados en posición enfrentada, por dentro de la junta tórica intermedia, para la entrada y salida del líquido portador del analito a analizar.

ES 2 304 076 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Célula de flujo con lámina sensora para determinaciones analíticas.

La presente invención se refiere a una célula de flujo para determinaciones analíticas, especialmente mediante técnicas analíticas de absorción y/o fluorescencia molecular realizadas en continuo, permitiendo llevar a cabo en el mismo dispositivo la reacción química y la medida.

Sector de la técnica

Desarrollo de instrumentación analítica. Química Analítica.

Estado de la técnica

Actualmente las medidas de fluorimetría y absorción molecular de un mismo analito se tienen que realizar por separado, suponiendo la necesidad de dos equipos distintos o dos células de flujo distintas. Por otro lado y previamente a la medición mediante absorción molecular o fluorimetría, se tiene que realizar la reacción química entre los distintos analitos y enzima/s, de tal manera que resulta un proceso largo en el tiempo y costoso.

Existe la necesidad de desarrollar dispositivos para la medición de analitos que permitan realizar medidas en continuo de manera rápida, sencilla y que sea fácilmente utilizable en la práctica habitual de un laboratorio y que abarate los costes.

El principal problema que resuelve esta invención es que permite la determinación de compuestos de interés bioquímico, basados en reacciones enzimáticas, de forma continua sin la necesidad de adicionar ningún reactivo. Tan sólo es necesaria la muestra sobre la que se va a llevar a cabo la determinación, ya que hace uso de las propiedades de absorción y/o fluorescencia, de la propia enzima libre o químicamente modificada.

Otro problema que soluciona la presente invención es que anteriormente se tenían que llevar a cabo por separado las medidas de fluorimetría y absorción molecular de un mismo analito. Con esta invención se pueden realizar ambas mediciones sin cambiar de célula de flujo simplemente realizando una pequeña modificación de una de las partes de la misma. Por lo tanto gracias a esto para ambas técnicas de medición, se utiliza el mismo tipo célula y en consecuencia se abaratan costes y tiempo.

Por otra parte hay determinados documentos presentes en el estado de la técnica como WO95/20051 que proponen emplear la inhibición enzimática sobre un sensor óptico químico, para determinar la concentración del compuesto inhibidor. La enzima es inmovilizada en las paredes de la cubeta, y en otras se inmoviliza el sustrato, y el compuesto óptimamente activo. Otra patente como ES2125986 se refiere a un biosensor óptico basado en enzimas, que se puede incorporar a celdas de flujo. Sin embargo la presente invención muestra una célula de flujo que comprende entre otras una lámina sensora en la cual ya están inmovilizadas las enzimas que tienen unido químicamente un fluoróforo para poder realizar en el mismo dispositivo las medidas de absorción y fluorescencia molecular. Por otro lado la patente FR2637912 que describe un "optrodo" enzimático, para la determinación de analitos de la cadena respiratoria, incluye una lámina sensora con material enzimático inmovilizado en forma reticulada y asociado a un material luminiscente.

La patente americana US4440497 permite hacer

medidas de absorbancia y fluorescencia, incluso simultáneamente pero sin embargo no consta de los elementos presentes en la invención, como la lámina sensora compuesta por enzimas inmovilizadas y que tienen unidas químicamente un fluoróforo.

Por otro lado todas las patentes encontradas en el estado de la técnica, hacen referencia a medidas en discontinuo y tienen que adicionar algún reactivo más, además de la enzima, puesto que no hacen uso de las propiedades espectroscópicas de un reactivo involucrado en la reacción enzimática, como es el caso de la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una célula de flujo para la determinación en continuo de compuestos por fluorescencia y/o absorción molecular de tal forma que la reacción química y el seguimiento de la misma, se pueden llevar a cabo en continuo, y con leves variaciones puede ser utilizado en un espectrofotómetro de absorción molecular o en un fluorímetro molecular. Por lo que soluciona los problemas del estado de la técnica comentados anteriormente.

La construcción de la célula de flujo tiene dos objetivos:

- llevar en un mismo dispositivo en continuo la reacción química y el seguimiento de la misma.
- utilizarlo, con leves variaciones, en un espectrofotómetro de absorción molecular o en un fluorímetro molecular.

La célula de flujo comprende cuatro partes o piezas que se sitúan una encima de la otra. Las cuatro piezas tienen ventanas alineadas para que pueda pasar la radiación si se va a trabajar en absorción. Si se va a trabajar en fluorescencia la pieza de abajo no tiene ventana. Sobre la última pieza se dispone una lámina sensora que se obtiene tras una reacción de polimerización, durante la cuál queda inmovilizada la enzima químicamente modificada que se vaya a utilizar, la cual tiene unida un fluoróforo con propiedades fluorescentes en la zona del visible. Este sistema permite llevar a cabo la reacción enzimática sin la necesidad de adicionar ningún otro reactivo, tan sólo la muestra objeto de análisis. Las enzimas se encuentran unidas a la lámina sensora mediante reacciones de polimerización en las cuales las enzimas se quedan atrapadas dentro de una red polimérica. La fabricación de dicha red consiste en la preparación de una mezcla que contiene acrilamida/bis-acrilamida y persulfato como precursor, junto con las enzimas a inmovilizar, en una disolución amortiguadora de fosfatos a pH 6. La polimerización se lleva a cabo mediante irradiación con luz UV. De esta manera, la lámina sensora presenta una gran estabilidad química y mecánica para la inmovilización de enzimas, llegando a alcanzar un tiempo de vida de entre 2 y 6 meses.

De esta manera se consiguen láminas sensoras finas y homogéneas que permiten su implementación en la célula de flujo para la medida en continuo de la señal analítica generada en cada caso (absorción y/o fluorescencia molecular).

Las mediadas se hacen en continuo. Por unos orificios situados en la pieza superior entra y sale la disolución con el analito. Éste reacciona con la lámina sensora produciendo un cambio en las propiedades ópticas.

En las medidas de absorción, el dispositivo se sitúa en el interior del espectrofotómetro alineado con la fuente de radiación y el detector.

En una realización preferida de la presente invención, si el espectrofotómetro es de doble haz, se construyen dos dispositivos idénticos.

En las medidas de fluorescencia el dispositivo se sitúa sustituyendo al compartimento de muestras del fluorímetro de manera que incida sobre la lámina sensora la radiación de excitación y la emitida vaya al detector.

Según una realización preferida de la presente invención las medidas se pueden realizar utilizando fibras ópticas.

Descripción de los dibujos

La constitución, funcionamiento y características de la célula de flujo de la invención se comprenderán mejor con la siguiente descripción, hecha con referencia al dibujo adjunto, en el que se muestra un despiece en perspectiva de una célula constituida de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de un modo de realización

La célula mostrada en el dibujo adjunto está constituida por cuatro placas iguales, de contorno rectangular, superpuestas, que se referencian con los números 1, 2, 3 y 4. Estas placas disponen de una abertura central rectangular, situadas en posiciones coincidentes en todas las placas y referenciadas con los números 5, 6, 7 y 8. Las cuatro placas disponen además de orificios enfrentados 9 para el paso de elementos de ensamblado y unión de las placas. Alrededor de las aberturas 5, 6, 7 y 8 las placas disponen, al menos en una de las superficies enfrentadas, de un canal anular 10 en el que se monta una junta tórica 11, entre cada dos placas consecutivas.

Las placas 1 y 2 disponen además, por dentro de

la junta tórica 11, de dos taladros pasantes cada una, referenciados con el número 12, que quedan en posición enfrentada y que sirven para la entrada y salida del analito a analizar.

La abertura central 6 de la placa 2 dispone de un rebaje periférico 13 para el encaje de una ventana de cuarzo 14 transparente, para el paso de la radiación que penetra a través de la abertura 5 de la placa 1. Esta ventana de cuarzo queda montada entre las placas 1 y 2 por dentro de la junta tórica 11, entre la cual y dicha ventana están situados los orificios pasantes 12 para la entrada y salida de la disolución que contiene el analito a analizar.

Del mismo modo, la placa 4 dispone, alrededor de la abertura central 8, de un rebaje periférico 15 para el montaje de una ventana de cuarzo 16 transparente, para el paso de la radiación. Por encima de esta ventana se dispone una lámina sensora 17, permitiendo esta constitución realizar medidas de absorción molecular. Cuando se desean realizar medidas de fluorescencia, la placa 4 carecerá de la abertura central 8 y de la ventana 16, siendo portadora únicamente de la lámina sensora 17.

Con la constitución comentada, las cuatro placas quedan superpuestas y unidas entre sí mediante elementos de unión introducidos a través de los orificios enfrentados 9 de las cuatro placas. Entre estas placas quedan montadas las ventanas 14 y 16, así como la lámina 17. A través de las diferentes aberturas 5, 6 y 8 pasará la radiación y la entrada y salida del líquido con el analito a analizar tendrá lugar a través de los orificios pasantes 12 enfrentados de las placas 1 y 2.

REIVINDICACIONES

1. Célula de flujo para determinaciones analíticas, especialmente mediante técnicas analíticas de absorción y/o fluorescencia molecular, **caracterizada** porque comprende cuatro placas superpuestas y unidas entre sí, de las cuales al menos las tres superiores disponen de otras tantas aberturas enfrentadas; una junta tórica de estanquidad dispuesta entre cada dos placas consecutivas, alrededor de la abertura central; al menos una ventana de cuarzo transparente montada entre las dos placas superiores, en coincidencia con la abertura central de las mismas; y una lámina sensora montada entre las dos placas inferiores, en coincidencia con la abertura central; disponiendo además las dos placas superiores de dos orificios pasantes cada una, situados en posición enfrentada, por dentro de la junta tórica intermedia, para la entrada y salida del líquido portador del analito a analizar.

2. Célula según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la placa inferior dispone adicionalmente

de una abertura central, enfrentada a la abertura de las otras placas, y entre las dos placas inferiores va montada una segunda ventana de cuarzo transparente, situada por debajo de la lámina sensora.

3. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque la lámina sensora contiene enzimas inmovilizadas.

4. Célula según la reivindicación 3, **caracterizada** porque en la lámina sensora las enzimas están unidas químicamente a un fluoróforo.

5. Célula según la reivindicación 3-4, **caracterizada** porque las enzimas se encuentran inmovilizadas a la lámina sensora mediante reacciones de polimerización.

6. Célula según la reivindicación 3-5, **caracterizada** porque la lámina sensora no necesita del aporte exterior de ningún otro reactivo.

7. Uso de la célula definida en las reivindicaciones anteriores para realización de mediciones en continuo de una señal analítica generada por absorción molecular y/o fluorescencia molecular.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

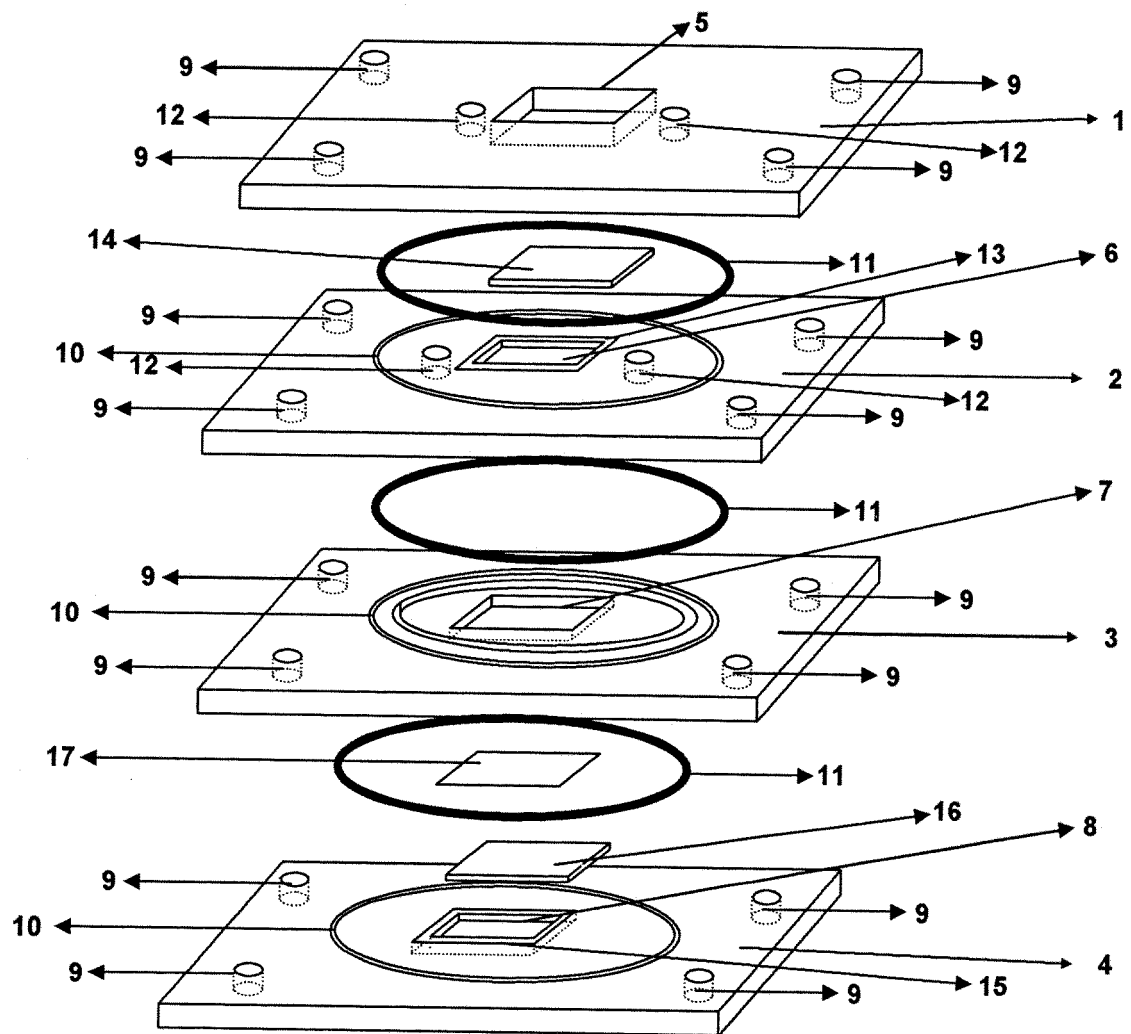


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 304 076

⑫ Nº de solicitud: 200503231

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 4440497 A (CORNIG GLASS WORKS) 03.04.1984, columna 2, líneas 28-68; columna 3, líneas 1-55; columna 5, líneas 3-36; figura 1; reivindicaciones 1-5.	1-7
Y	FR 2637912 A1 (UNIVERSITÉ DE PARIS VII) 20.04.1990, página 3, líneas 8-19; página 5, líneas 23-25; página 6, líneas 26-36; página 10, líneas 8-36; página 11, líneas 1-20; reivindicaciones 1-8.	1-7
A	ES 2125986 T3 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS, ARS HOLDING N.V.) 29.03.1995, columna 2, líneas 55-62; columna 3, líneas 9-67; columna 4, líneas 1-22; columna 5, líneas 1-7; reivindicaciones 1-2.	1-7
A	SANZ et al. "Application of Molecular Absorption Properties of Horseradish for Self-Indicating Enzymatic Interactions and Analytical Methods" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 26.05.2005 Vol. 127, Nº. 3, páginas 1038-1048; apartados 1 y 4.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.08.2008

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/1