

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 601**

21 Número de solicitud: 202130254

51 Int. Cl.:

G01N 21/01 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.03.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.10.2022

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

JURADO SÁNCHEZ, Beatriz;
YUAN, Kaisong;
DE LA ASUNCIÓN NADAL, Víctor y
ESCARPA MIGUEL, Jesús Alberto

54 Título: **DISPOSITIVO PORTÁTIL CON DETECCIÓN FLUORESCENTE BASADO EN MICROMOTORES MAGNÉTICOS Y CATALÍTICOS, Y PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN**

57 Resumen:

Se detalla en este documento un dispositivo portátil con detección fluorescente basado en micromotores magnéticos y catalíticos para la detección integrada de biomarcadores (Hg^{2+} y toxinas bacterianas), y que consiste en una plataforma portable diseñada específicamente para el dispositivo móvil o tablet de interés con una impresora 3D y que integra un controlador (3) con filtros de emisión de bajo coste (9) y una lente de alto aumento (10), ambos acoplados directamente con la cámara del controlador y un puntero láser (7) que incide directamente sobre la muestra (5). El dispositivo permite grabar vídeos y observar a tiempo real los cambios en la fluorescencia en la superficie de micromotores Janus magnéticos recubiertos de nanomateriales 2D y puntos moleculares o cambios en la fluorescencia de disoluciones conteniendo micromotores tubulares catalíticos modificados con receptores fluorescentes. Estos cambios se relacionan directamente con la concentración del analito.

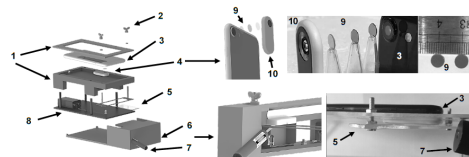


FIG. 1A

DESCRIPCIÓN

DISPOSITIVO PORTÁTIL CON DETECCIÓN FLUORESCENTE BASADO EN MICROMOTORES MAGNÉTICOS Y CATALÍTICOS, Y PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a un dispositivo portátil basado en micropartículas y nanopartículas en movimiento o micromotores y nanomotores para bioanálisis basado en
10 detección fluorescente. Este dispositivo resulta ser un sistema aplicable a cualquier teléfono o tableta inteligente sin la necesidad de *software* específico para bioanálisis a tiempo real en muestras biológicas. Se pueden diseñar *apps* sencillas para análisis acoplado a cualquier dispositivo.

15 El objeto de la invención se encuadra en el campo de la química analítica, más concretamente en la química analítica basada en la nanotecnología y los nanomateriales para aplicaciones de biosensado en el sector clínico, agroalimentario y medioambiental.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

En el campo de la salud, el desarrollo de dispositivos de diagnóstico descentralizados es esencial para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades, en especial enfermedades infecciosas. En efecto, estos dispositivos pueden ayudar a reducir la carga en los hospitales y las unidades de atención primaria, sin mencionar su enorme potencial en
25 países no desarrollados. El auge de la tecnología de teléfonos inteligentes en conexión con los dispositivos “*point-of-care*” (POC) ha permitido el desarrollo de (bio)-sensores miniaturizados como plataformas de diagnóstico novedosas. En tales configuraciones, los dispositivos inteligentes se pueden utilizar como simples sistemas de lectura y procesamiento o como parte integral del sistema. La detección puede ser óptica, electroquímica e incluso
30 basada en características morfológicas o motrices detectables empleando técnicas de imagen como la microscopía óptica.

La detección óptica de fluorescencia ofrece grandes ventajas cuando se combina con un dispositivo inteligente, debido a que estos están equipados con cámaras de alta resolución
35 fácilmente acoplables a lentes de aumento y filtros de fluorescencia de bajo coste. La lectura

se puede realizar en tiempo real o en el punto final después del tratamiento de la muestra en *microchips* o tiras de papel, entre otros métodos de tratamiento de bajos volúmenes de muestra. A continuación, se describirán sistemas de análisis POC acoplados a tecnología móvil para proporcionar antecedentes relacionados con estos sistemas. Primero se describirán dos POCs para la determinación de las bacterias *Escherichia Coli* (Biosens. Bioelectron. 2019, 145, 111624) y *Staphylococcus Aureus* (Sens. Actuat. B. Chem. 2019, 298, 126849) en muestras de orina y sangre. Ambas plataformas integran *microchips* para realizar inmunoensayos de flujo lateral previos a la determinación de las bacterias, con un tiempo de análisis de 30 minutos, pero sin la posibilidad de llevar a cabo la detección a tiempo real. Un *microchip* de tratamiento de muestra similar se ha utilizado acoplado a otra plataforma POC con detección fluorescente para el análisis del antígeno prostático específico en sangre total, con un tiempo de análisis de 15 minutos (Biosens. Bioelectron. 2015, 70, 5). Se ha llevado a cabo la detección de virus con dispositivos basados en detección fluorescente e integrado *microchips* de pretratamiento de muestra modificados con receptores específicos, o bien empleando la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que consigue una mejora importante de la sensibilidad a costa de un elevado tiempo de análisis (30-60 min) (ACS Nano 2015, 9, 3060; Lab Chip 2020, 20, 1621; Anal. Chem. 2020, 92, 2258). Como alternativa a los *microchips*, se han empleado tiras de papel modificadas con anticuerpos, puntos moleculares y otras nanopartículas para la detección del virus del Zika (Anal. Chim. Acta 2019, 1055, 140), así como biomarcadores de insuficiencia cardíaca (ACS Nano 2017, 11, 6261) o infecciones (ACS Sus. Chem. Eng. 2020, 8, 8175). Las plataformas POC están equipadas con un soporte especial para colocar la tira de papel para una lectura sencilla. Como puede observarse, todas estas aproximaciones requieren del empleo de etapas de tratamiento previas de la muestra, sin posibilidad de llevar a cabo la detección sin una etapa de pretratamiento y con un coste relativamente elevado.

Los micromotores son partículas de tamaño micrométrico, capaces de realizar un movimiento autónomo en disolución en respuesta a un estímulo específico. Estos dispositivos tienen un enorme potencial para el desarrollo de nuevas estrategias de biosensado utilizando bajos volúmenes de muestra y reactivos. La funcionalización dirigida y el tamaño micro y nanométrico de los micromotores y nanomotores hacen que estos microdispositivos autónomos sean ideales para el diseño de POCs basados en el transporte activo de los marcadores y los elementos de reconocimiento, que resulta favorable respecto a la difusión pasiva de los mismos. La detección y el tratamiento de la muestra se pueden realizar de forma dinámica utilizando los micromotores en movimiento, evitando el uso de *microchips* o etapas

previas de preparación de la muestra.

Se han descrito solo dos POCs basados en el empleo de partículas en movimiento, cuyo principio de detección se basa en la medida del desplazamiento de estas partículas en presencia de distintas concentraciones del analito. En efecto, se han utilizado nanopartículas de platino y nanopartículas de poliestireno (2-3 micras) modificadas con anticuerpos o ADN para la detección del virus ZIKA y VIH, respectivamente. En la primera estrategia, la presencia del virus ZIKA provoca la acumulación de nanopartículas de platino en la superficie de las partículas de poliestireno, favoreciendo su movimiento (ACS Nano 2018, 12, 5709). En la segunda estrategia, la presencia de VIH resulta en la disminución de la velocidad del micromotor (Nat. Commun., 2018, 9).

Como puede observarse, la complejidad de las estrategias de detección mencionadas anteriormente hace necesario el diseño de *microchips* diseñados específicamente para llevar a cabo las etapas de modificación previas -que pueden además conllevar tiempos de reacción elevados, lo que limita la detección rápida a tiempo real- además del empleo de receptores biológicos que presentan un elevado coste y baja estabilidad. No se puede visualizar directamente las partículas activas -dado su reducido tamaño- por lo que adicionalmente se requiere de un *software* específico para analizar el movimiento de estas, lo que hace complejo su uso por parte de personal no especializado.

En el documento WO/2019/213479 se describe la detección basada en movimiento integrada en un dispositivo portátil empleando nanopartículas de poliestireno y platino. La principal diferencia es que no se puede llevar a cabo la visualización de las partículas a tiempo real, por lo que requiere de software especializado. No se basa en micromotores Janus sino en partículas auto ensambladas en presencia del analito de interés. No incluye tiras de detección, requiere el empleo de material biológico como elemento de reconocimiento adicional y además el empleo de un microchip para depositar la muestra. Tampoco se lleva a cabo detección fluorescente. En los documentos US 2013/0084569, US 2014/045179 y WO2017017309A1 se describen estrategias de detección basadas en movimiento empleando nanohilos metálicos y micromotores tubulares. La principal diferencia es que no se emplean micromotores Janus, no se puede emplear en medios biológicos y la detección no se lleva a cabo de forma integrada en dispositivos móviles, sino que requiere de un microscopio óptico de alta resolución. El documento ES2365748T3 describe el desarrollo de un módulo con fuentes de excitación, emisión y compartimento de muestra para detección fluorescente. La

principal diferencia con la invención propuesta es que el módulo está acoplado a un ordenador de sobremesa, no es una plataforma portable, no permite la detección a tiempo real ni la visualización de imágenes y no se basa en micromotores.

5 En resumen y dado el estado de la técnica actual, la invención propuesta resuelve un problema técnico importante, esto es, la detección analítica mediante aproximaciones fluorescentes basada en el empleo de micromotores, evitando el uso de microscopios de alta resolución, *microchips* acoplados o *software* específico. Las principales ventajas son la simplificación de la etapa de detección, reducción en los tiempos de análisis, volúmenes muy
10 reducidos de muestra, detección directa y a tiempo real en fluidos biológicos sin necesidad de etapas de preparación previas o reactivos adicionales y la posibilidad del empleo universal de la plataforma por personal no especializado; ya que la medida se realiza directa y visualmente. Es posible además el desarrollo de *software* específico o tiras reactivas para uso por parte de personal no especializado.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la invención es un dispositivo que permite la detección integrada, en un teléfono inteligente o similar, de biomarcadores, basados en cambios en la fluorescencia de la
20 disolución o de la superficie de micromotores catalíticos y/o magnéticos que integran receptores marcados fluorescentemente o puntos moleculares, entre otros.

La aplicabilidad de la plataforma se demuestra en la observación de la fluorescencia de disoluciones de puntos moleculares, así como en dos aplicaciones relevantes: detección "ON-OFF" de iones metálicos - Hg^{2+} - empleando micromotores magnéticos Janus modificados con
25 puntos cuánticos de fluorescencia y detección de "OFF-ON" de toxinas bacterianas -toxina de cólera B, CTB- con micromotores catalíticos tubulares modificados con un péptido de afinidad marcado con una molécula fluorescente.

30 El dispositivo se integra en una plataforma, preferentemente diseñada específicamente para cada modelo de teléfono o tableta con una impresora 3D, que además integra un sistema que permite enfocar la muestra para una mejor visualización y filtros de emisión de bajo coste hechos a medida directamente acoplados a la cámara, un soporte de muestra ajustable para acomodar un portaobjetos de vidrio, fuentes de excitación láser intercambiables y un sistema
35 de iluminación de muestra.

Es objeto de invención, además, un procedimiento para la detección de biomarcadores, que hace uso del dispositivo anterior, y que comprende tres etapas principales:

- 1) aplicación de una muestra en un portaobjetos,
- 2) adición de los micromotores y/o un surfactante y el peróxido de hidrógeno y
- 3) visualización directa en la pantalla del teléfono y medida de la concentración de mercurio, toxinas u otros analitos de interés mediante procesamiento de las imágenes fluorescentes con un *software* específico o comparación con tiras reactivas.

Dado el estado de la técnica actual, la invención propuesta resuelve un problema técnico importante, esto es, la detección directa utilizando pequeñas cantidades de muestra, del orden de los microlitros y micromotores, como alternativa a las tiras de papel o *microchips* para el procesamiento de muestra. La versatilidad de la estrategia permite una fácil integración de las estrategias de detección de micromotores basadas en diferentes mecanismos de propulsión y con detección de fluorescencia de una gran cantidad de biomarcadores.

La invención propuesta resuelve una importante limitación existente hasta la fecha en el ámbito del desarrollo de estrategias analíticas fluorescentes para la detección de biomarcadores empleando micromotores, que requieren del empleo de microscopios ópticos de fluorescencia de alta resolución, no disponibles en laboratorios de rutina y que no han hecho posible la aplicabilidad práctica de estas estrategias.

La presente invención describe, por tanto, una plataforma universal de sensado y biosensado analítico basado en monitorizar cambios en la fluorescencia de la disolución o de los propios micromotores. La versatilidad del dispositivo permite integrar fácilmente futuras configuraciones basadas en micromotores, pero llevando a cabo detección colorimétrica.

En un aspecto de la invención, el dispositivo comprende un módulo de medida con un portaobjetos para depositar directamente microlitros de muestra, disoluciones de puntos moleculares, uno o más micromotores catalíticos o magnéticos introducidos en la muestra y los reactivos necesarios para favorecer su movimiento.

La observación directa en la pantalla de visualización permite la identificación cuantitativa de la concentración de los distintos biomarcadores en la muestra objeto de estudio.

Concretamente, en una realización preferente de la invención, el dispositivo comprende, en

primer lugar, el módulo de medida, que a su vez comprende un controlador, como puede ser un teléfono inteligente u otro dispositivo de lectura; una plataforma 3D que puede ser diseñada y modificada fácilmente con un *software* comercial; un soporte de muestra, acoplado a la plataforma, para colocar un portaobjetos de vidrio; un láser comercial integrado en un compartimento y orientado de forma que el haz de luz incide de forma perpendicular sobre el portaobjetos de vidrio; una fuente de iluminación, de tipo LED preferentemente, acoplada a la plataforma y conectada al controlador, de forma que es alimentada por este.

En un aspecto de la invención, el soporte de muestra está equipado con tornillos regulables que permiten mover el soporte de muestra verticalmente en el eje óptico de la cámara con el objetivo de enfocar el micromotor o la gota conteniendo la muestra.

El controlador comprende una cámara a la que lleva acoplada directamente, mediante una pegatina adhesiva preferentemente, una lente de alto aumento comercial (20-400 aumentos) y filtros de emisión diseñados específicamente para el conjunto lente-cámara. La cámara del controlador se puede utilizar también para grabar vídeos de los micromotores en movimiento o de cambios en la fluorescencia de la disolución. El controlador comprende asimismo una pantalla asociada a la cámara en la que se observa la fluorescencia de la disolución o de la superficie de los micromotores.

En segundo lugar, el dispositivo comprende de uno o más micromotores modificados con receptores específicos como nanopartículas, puntos moleculares fluorescentes o biomoléculas marcadas con una molécula fluorescente. Los micromotores pueden estar compuestos por partículas de poliestireno, nanomateriales de carbono, nanomateriales 2D y contener capas catalíticas como nanopartículas de platino y capas magnéticas como nanopartículas de ferrita o níquel.

En tercer lugar, el dispositivo puede integrar un *software* de procesamiento automático de la señal fluorescente o tiras reactivas prediseñadas para correlacionar los cambios de la intensidad de fluorescencia en la disolución o en la superficie del micromotor con la concentración del analito.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor

comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

- 5 Figura 1A.- Muestra una vista lateral del dispositivo, con fotografías y dibujos esquemáticos, en una realización en la que el controlador es un teléfono inteligente.

Figura 1B.- Muestra las especificaciones de los filtros de emisión empleados en el dispositivo.

- 10 Figura 2.- Muestra distintas configuraciones de fuentes de excitación láser y filtros de emisión para la toma de imágenes fluorescentes de puntos moleculares en disolución y en la superficie de los micromotores y sus correspondientes histogramas en escala logarítmica (F: fondo, M: muestra).

- 15 Figura 3A.- Muestra un esquema del principio de detección de iones Hg^{2+} empleando micromotores Janus propulsados por campos magnéticos y modificados con puntos moleculares e imágenes de fluorescencia reales de los micromotores obtenidas con el dispositivo antes y después de la adición de Hg^{2+} ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

- 20 Figura 3B.- Muestra imágenes de fluorescencia de los micromotores Janus en disoluciones conteniendo $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hg^{2+} y otros interferentes empleando el dispositivo (9) y un microscopio óptico de alta resolución (10).

- 25 Figura 3C.- Muestra un gráfico de barras con la intensidad de fluorescencia normalizada de los micromotores Janus en presencia de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hg^{2+} y otros interferentes empleando el dispositivo (barra negra a la izquierda) y un microscopio óptico de alta resolución (barra gris a la derecha).

- 30 Figura 3D.- Muestra imágenes de fluorescencia de los micromotores Janus en disoluciones conteniendo concentraciones crecientes de Hg^{2+} empleando el dispositivo y un microscopio óptico de alta resolución.

Figura 3E.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del Hg^{2+} empleando el dispositivo y un microscopio óptico de alta resolución.

Figura 3F.- Muestra una tabla con las características analíticas para la detección de Hg^{2+} .

Figura 4A.- Muestra un esquema del principio de detección de toxinas bacterianas empleando micromotores tubulares modificados con un péptido de afinidad fluorescente y propulsados por campos catalíticos e imágenes de fluorescencia reales obtenidas con el dispositivo.

Figura 4B.- Muestra un gráfico de barras con la intensidad de fluorescencia normalizada de disoluciones conteniendo micromotores tubulares catalíticos modificados con un péptido de afinidad específico para CTB en presencia de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ del analito objeto de estudio y otros interferentes; empleando el dispositivo (barra negra a la izquierda) y un microscopio óptico de alta resolución (barra gris a la derecha).

Figura 4C.- Muestra imágenes de fluorescencia en disoluciones conteniendo los micromotores tubulares y concentraciones crecientes de la toxina de cólera B empleando el dispositivo (9) y un microscopio óptico de alta resolución (10).

Figura 4D.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado de la CTB empleando el dispositivo y un microscopio óptico de alta resolución.

Figura 4E.- Muestra una tabla con las características analíticas para la detección de CTB.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A la vista de las figuras 1 a 4, se describe a continuación un ejemplo de realización preferente de la invención.

Un primer objeto de invención, que se muestra en detalle en la figura 1, es un dispositivo móvil portátil para la detección fluorescente de biomarcadores empleando micromotores Janus o tubulares, entre otros propulsados por mecanismos catalíticos, campos magnéticos, radiación electromagnética, gradientes de presión o temperatura u otros mecanismos de propulsión. Tal y como se muestra en la figura, el dispositivo comprende una plataforma (8), que integra a su vez sendas plataformas (1, 6) impresas en 3D que se pueden diseñar y modificar con *softwares* comerciales. Acoplada a la plataforma (1), el dispositivo comprende un controlador, que en una realización preferente es un teléfono inteligente (3) y un soporte de muestra (5) al que se conecta un portaobjetos, que junto con tornillos ajustables (2), permiten mover la

plataforma (1) para el enfoque de la muestra, alejando y acercando el soporte de muestra a la lente (5), de manera similar a un microscopio óptico de alta resolución.

Además, como se puede ver en la figura 1, la plataforma (1) está integrada en otra plataforma diseñada específicamente para el controlador empleado y constituido por materiales opacos (6) que presenta una apertura para acoplar un puntero láser comercial (7) de forma que el haz de luz emitido por el mismo incide directamente sobre el portaobjetos acoplado al soporte de muestra (5). Acoplada a la cámara del teléfono inteligente, el dispositivo comprende una lente (10) comercial de alto aumento, que se puede acoplar y desacoplar del mismo mediante una tira adhesiva y filtros de emisión (9) diseñados específicamente para el conjunto lente-cámara y la aplicación requerida. La figura 1B muestra los perfiles de transmitancia de los filtros empleados en el dispositivo móvil para la detección de los analitos objeto de estudio.

Para la preparación de los micromotores Janus se emplean micropartículas comerciales de poliestireno (20 micras de diámetro) que se dispersan en forma de monocapa en un portaobjetos de vidrio. Posteriormente la monocapa se recubre con una capa de oro de ~ 50 nm mediante pulverización catódica. Las micropartículas recubiertas de oro se dispersan posteriormente en agua ultrapura por sonicación (0.9 mL) y se mezclan con 0.1 mL de óxido de grafeno modificado con grupos sulfhidrilo durante 2h para promover la unión al oro por enlaces tiol. Esta disolución se filtra para eliminar el exceso de reactivos, se dispersa en agua ultrapura (1 mL) y se mezcla con 20 μL de una disolución conteniendo 1 mg mL^{-1} de nanopartículas de ferrita durante 1h. Posteriormente se filtra esta disolución y se mezcla con 5 μL de una disolución conteniendo puntos moleculares comerciales de $\text{Cd}_x\text{Se}_{1-x}@\text{ZnS}$ o puntos moleculares sintetizados en el laboratorio que emitan a distintas longitudes de onda características.

Para la preparación de los micromotores tubulares, se emplean micromotores constituidos por una capa externa de nanomateriales 2D (grafeno, grafdiino, MoS_2 , WS_2 , entre otros) y una capa interna catalítica de platino preparados mediante la técnica de electrodeposición en membrana. Posteriormente se mezclan aproximadamente 500,000 micromotores con 100 μL de una disolución comercial conteniendo un bioreceptor marcado fluorescentemente, que puede ser un péptido de afinidad marcado con rodamina o similar, 150 μL de dodecilsulfato sódico al 3% y 200 μL de una disolución acetonitrilo:agua (1:3) durante 1h.

La invención presenta una elevada versatilidad, permitiendo emplear punteros láser que

emitan luz a distintas longitudes de onda y distintos filtros de emisión dependiendo de las características del punto molecular, molécula o receptor fluorescente acoplado al micromotor. La figura 2 muestra ejemplos de distintas configuraciones de puntero láser y filtros de emisión para la visualización de puntos moleculares en disolución y en la superficie de micromotores Janus. A la izquierda de la figura se muestran la longitud de onda de excitación y de emisión seleccionadas, para lo cual se utilizaron distintos punteros láser (7) y los filtros verde, amarillo y rojo (9) (de arriba abajo, respectivamente), posicionando el filtro directamente sobre la cámara del teléfono inteligente (3) situada en la parte inferior del mismo y antes de acoplar la lente de alto aumento (10). Para la captura de las imágenes se deposita una gota de 1 μL de la disolución de los puntos moleculares o micromotores Janus sobre el portaobjetos acoplado al soporte de muestra (5). Se enfoca la muestra empleando los tornillos ajustables (2) y se lleva a cabo la visualización directa en la pantalla del teléfono inteligente (3). Posteriormente, se acciona el puntero láser específico acoplado (7) y se toman fotografías con la cámara del teléfono inteligente, como las mostradas en la figura 2. Los histogramas del fondo (F) y la muestra (M) que se ilustran en la figura, correspondientes a cada imagen fluorescente, indican la idoneidad de las configuraciones evaluadas y el correcto funcionamiento del dispositivo.

La estrategia para la detección de Hg^{2+} se muestra en la figura 3A. Para este fin, el dispositivo comprende, además de la plataforma, unos micromotores Janus de 20 μm de diámetro y modificados con puntos moleculares cuyo tamaño es ideal para la observación con el dispositivo inteligente acoplado a la plataforma. Para llevar a cabo la detección con el dispositivo se posiciona el portaobjetos en el soporte de muestra (5) de la plataforma de visualización y se añade 1 μL de la disolución conteniendo los micromotores Janus, y 1 μL de disolución conteniendo la muestra. Se utiliza un láser comercial que emite luz a 405 nm y el filtro de emisión verde. El dispositivo se posiciona sobre un módulo que genera campos magnéticos rotatorios para inducir el movimiento de los micromotores. Una vez accionado el dispositivo, se acciona el puntero láser comercial (7) y mediante la cámara del teléfono inteligente (3) se graban videos de los micromotores magnéticos en movimiento. En ausencia de Hg^{2+} , los micromotores presentan una elevada emisión fluorescente (ON). Cuando se añade este ion se produce un intercambio catiónico con el Zn^{2+} presente en la superficie de los puntos moleculares unidos al micromotor, que es reemplazado por el Hg^{2+} , generándose HgS y produciéndose un apagamiento de la fluorescencia inicial (OFF) que se puede relacionar con la concentración del Hg^{2+} , permitiendo así determinar este analito. Un ejemplo se muestra en las imágenes de microscopía óptica en la parte inferior de la figura 3a (en ausencia y presencia de Hg^{2+}) que ilustran claramente las diferencias en la fluorescencia del

micromotor a simple vista.

En figuras 3b y 3c se describe la selectividad de la estrategia de detección de Hg^{2+} en presencia de otros cationes metálicos interferentes como Ca, Cd, Mn, Ni y Zn. Siguiendo el protocolo de uso se graban vídeos del micromotor magnético Janus en disoluciones conteniendo $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada catión. Como se puede ver en las imágenes fluorescentes del micromotor capturadas empleando el dispositivo (9) y el microscopio (10) de alta resolución de la figura 3b y en el gráfico de barras de la figura 3c, la fluorescencia del micromotor no varía bajo la presencia de una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto interferente, en comparación con la disminución drástica observada en el caso de Hg^{2+} . Tales resultados atestiguan la alta selectividad del protocolo de detección, probablemente debido a que los cationes interferentes no interaccionan con el Zn^{2+} de la superficie de los puntos moleculares.

En las figuras 3D-3F se describe la validación analítica de la estrategia propuesta para la detección de Hg^{2+} . Los resultados obtenidos con el dispositivo deben validarse y compararse con los obtenidos con un microscopio óptico de alto rendimiento. Para ello, se graban vídeos del micromotor en movimiento en disoluciones de agua ultrapura concentraciones crecientes de Hg^{2+} (de 0.2 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) tal y como se ha indicado anteriormente. La figura 3D muestra capturas de los vídeos obtenidos empleando el dispositivo portátil en la parte superior (9) y un microscopio óptico de alta resolución en la parte inferior (10). Como puede verse, a medida que aumenta la concentración de Hg^{2+} , hay una disminución en la fluorescencia del micromotor. Los datos se procesaron para obtener gráficos de calibración utilizando la intensidad fluorescente del micromotor como señal analítica. La Figura 3E muestra las gráficas de calibración obtenidas utilizando tanto el teléfono inteligente como el microscopio óptico de alta resolución. Las características analíticas relevantes se resumen en la tabla de la figura 3F. Los límites de detección obtenidos fueron $0.09 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando el microscopio y el teléfono inteligente, respectivamente, con un intervalo lineal que se extiende hasta $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en ambos casos.

La estrategia para la detección de toxinas bacterianas (como ejemplo se ha seleccionado la toxina de cólera B, CTB) se muestra en la figura 4A. Para este fin, el dispositivo comprende, además de la plataforma de medida, unos micromotores tubulares modificados con un receptor fluorescente (péptido de afinidad B-VQCRLGPPWCAK marcado con rodamina B). Para llevar a cabo la detección con el dispositivo se posiciona el portaobjetos en el soporte de muestra (5) de la plataforma de visualización y se añade $1 \mu\text{L}$ de la disolución conteniendo los

micromotores tubulares, 1 μL de disolución conteniendo la muestra 1 μL de una disolución conteniendo un surfactante y 1 μL de peróxido de hidrógeno al 4%. Se utiliza un láser comercial que emite luz a 532 nm y el filtro de emisión rojo. Una vez accionado el dispositivo, se acciona el puntero láser comercial (7) y mediante la cámara del teléfono inteligente (3) se graban vídeos de los micromotores en movimiento. En ausencia de la toxina de cólera B, la disolución no presenta emisión fluorescente (OFF) dado que la fluorescencia nativa del péptido está atenuada en la gota por la unión del péptido al material 2D presente en la superficie del micromotor. Cuando se añade la toxina, se produce un aumento en la intensidad de fluorescencia de la disolución (ON) debido a que el péptido unido al micromotor tiene una mayor afinidad por el analito que por la superficie del micromotor, por lo que se libera en disolución, recuperándose su intensidad de fluorescencia nativa, que se puede relacionar con la concentración de la CTB, permitiendo así determinar este analito. Un ejemplo se muestra en las imágenes de microscopía óptica en la parte inferior de la figura 4a (en ausencia y presencia de toxinas) que ilustran claramente las diferencias en la fluorescencia de la disolución a simple vista.

En la figura 4B, además, se describe la selectividad de la estrategia de detección de la CTB de otras toxinas como la endotoxina de la bacteria *Escherichia Coli* (LPS) y la proteína de albúmina de suero bovino (BSA). Como se puede ver en el gráfico de barras de la figura 4B empleando el dispositivo y el microscopio de alta resolución, la fluorescencia de la disolución no varía bajo la presencia de una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto interferente, en comparación con el incremento drástico observado en el caso de la CTB. Tales resultados atestiguan la alta selectividad del protocolo de detección, probablemente debido a la baja afinidad del péptido de afinidad específico unido al micromotor hacia los interferentes. La estrategia puede extenderse para su aplicación a otros bioanalitos como proteínas, miRNA, etc.

En las figuras 4C-4E se describe la validación analítica de la estrategia propuesta para la detección de la toxina de cólera B. Los resultados obtenidos con el dispositivo deben validarse y compararse los resultados con los obtenidos con un microscopio óptico de alto rendimiento. Para ello, se graban vídeos del micromotor en movimiento en disoluciones de agua ultrapura concentraciones crecientes de CTB (de 0.001 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tal y como se ha indicado anteriormente. La figura 4C muestra capturas de los vídeos obtenidos empleando el dispositivo portátil en la parte superior (9) y un microscopio óptico de alta resolución en la parte inferior (10). Como puede verse, a medida que aumenta la concentración de CTB, hay

un aumento de la fluorescencia de la disolución. Los datos se procesaron para obtener gráficos de calibración utilizando la intensidad fluorescente de la disolución como señal analítica. La Figura 4D muestra las gráficas de calibración obtenidas utilizando tanto el teléfono inteligente como el microscopio óptico de alta resolución. Las características analíticas relevantes se resumen en la tabla de la figura 4E. Los límites de detección obtenidos fueron $1.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando el microscopio y el teléfono inteligente, respectivamente, con un intervalo lineal que se extiende hasta 5000 ng mL^{-1} en ambos casos.

La invención puede aplicarse al análisis clínico, en hospitales a pie de cama del paciente, a la industria farmacéutica para el control de procesos de fabricación de fármacos, en la industria agroalimentaria para el control de contaminantes y en la industria medioambiental para la monitorización de contaminantes.

Por otra parte, es asimismo, objeto de invención un procedimiento para la detección fluorescente de biomarcadores y otros analitos, que hace uso del dispositivo anterior, y que comprende las siguientes etapas:

- deposición de una muestra en el portaobjetos posicionado sobre el soporte de muestra (5),
- deposición de los micromotores y/o peróxido de hidrógeno y/o un surfactante en la muestra,
- colocación del dispositivo sobre un módulo que genera campos magnéticos rotatorios u oscilantes que inducen el movimiento del micromotor,
- irradiación de la muestra con un puntero láser comercial (7),
- determinación de la fluorescencia inicial y final de la superficie del micromotor o de la disolución en la que se mueve el micromotor en presencia de un analito mediante visualización directa y grabado de vídeos con la cámara del controlador (3),
- determinación de la fluorescencia de los micromotores y del medio en la muestra,
- determinación de la concentración del analito en la muestra a partir de los cambios de fluorescencia en los micromotores o en la disolución.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo portátil con detección fluorescente basado en micromotores magnéticos y catalíticos, con geometría preferentemente Janus, tubular o helicoidal, que comprende:

- 5 - una plataforma de medida, que a su vez comprende:
- dos plataformas (1, 6) soporte,
 - un controlador (3) acoplado a la plataforma (1), y que comprende una cámara y una pantalla de visualización,
 - un filtro de emisión diseñado a la carta (9) acoplado a la cámara del controlador,

10 ○ una lente (10) de alto aumento acoplada a la cámara del controlador (3) equipada con el filtro de emisión,

 - un soporte de muestra (5) acoplado a la plataforma (1) en un lado opuesto al controlador (3) y enfrentado a la cámara,
 - un portaobjetos configurado para recibir una muestra,

15 ○ una plataforma opaca (6) con una abertura para la introducción de un puntero láser comercial (7) que incide directamente sobre el portaobjetos posicionado en el soporte de muestra (5),

 - uno o más micromotores destinados a introducirse en la muestra y con capacidad de propulsarse autónomamente en presencia o ausencia de un analito en la muestra.

20 2.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el módulo de medida comprende adicionalmente unos tornillos (2) que conectan el soporte de muestra (5) y la plataforma (1) permitiendo su desplazamiento en el eje óptico de la cámara con la finalidad de enfocar la muestra.

25 3.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el controlador es un teléfono o una tableta inteligentes.

30 4.- El dispositivo de la reivindicación 1, en la que los micromotores tienen una estructura esférica, tubular, helicoidal o nanohilos, entre otros.

 5.- Dispositivo de la reivindicación 1 en el que los micromotores Janus son una partícula de poliestireno o sílice.

35 6.- El dispositivo de la reivindicación 5 en el que la partícula de poliestireno o sílice está

recubierta de una capa de oro.

7.- El dispositivo de la reivindicación 6 en la que la partícula de poliestireno o sílice recubierta de una capa de oro está recubierta por una capa de nanomaterial 2D.

5

8.- El dispositivo de la reivindicación 7 en la que el nanomaterial 2D es óxido de grafeno.

9.- El dispositivo de la reivindicación 8, en la que la partícula de poliestireno o sílice de diámetro recubierta de una capa de oro y de nanomaterial 2D integra un metal magnético.

10

10.- El dispositivo de la reivindicación 9, en el que los micromotores están modificados con anticuerpos, péptidos de afinidad y/o puntos moleculares.

11.- El dispositivo de la reivindicación 1, en el que los micromotores tubulares son una partícula con una capa externa de materiales 2D y una capa interna catalítica.

15

12.- El dispositivo de la reivindicación 11, en la que el nanomaterial 2D está seleccionado entre grafeno, grafito, MoS₂ o WS₂. una capa interna catalítica.

20

13.- El dispositivo de la reivindicación 12, en la que el metal catalítico es platino.

14.- El dispositivo de la reivindicación 13, en el que los micromotores están modificados con anticuerpos, péptidos de afinidad y/o puntos moleculares.

25

15.- Procedimiento para la detección de Hg²⁺, que hace uso del dispositivo de la reivindicación 1, y que comprende las etapas de:

- deposición de una muestra en el portaobjetos acoplado al soporte de muestra (5),
- deposición de los micromotores en la muestra,
- colocación del dispositivo sobre un módulo que genera campos magnéticos rotatorios u oscilantes que inducen el movimiento del micromotor,
- irradiación de la muestra con un puntero láser comercial (7),
- determinación de la intensidad fluorescente inicial y final del micromotor en presencia de un analito mediante visualización directa y grabado de vídeos con la cámara del controlador (3),
- determinación de la intensidad fluorescente de los micromotores y del medio en la

30

35

muestra y

- determinación de la concentración del analito en la muestra a partir de la fluorescencia de los micromotores o la gota.

5 16.- Procedimiento para la detección de toxinas bacterianas, que hace uso del dispositivo de la reivindicación 1, y que comprende las etapas de:

- deposición de una muestra en el portaobjetos acoplado al soporte de muestra (5),
- deposición de los micromotores y/o peróxido de hidrógeno y/o un surfactante en la muestra,
- 10 - irradiación de la muestra con un puntero láser comercial,
- determinación de la intensidad fluorescente inicial y final de la disolución en presencia de un analito mediante visualización directa y grabado de vídeos con la cámara del controlador (3),
- determinación de la intensidad fluorescente de la disolución, y
- 15 - determinación de la concentración del analito en la muestra a partir de la fluorescencia de la disolución.

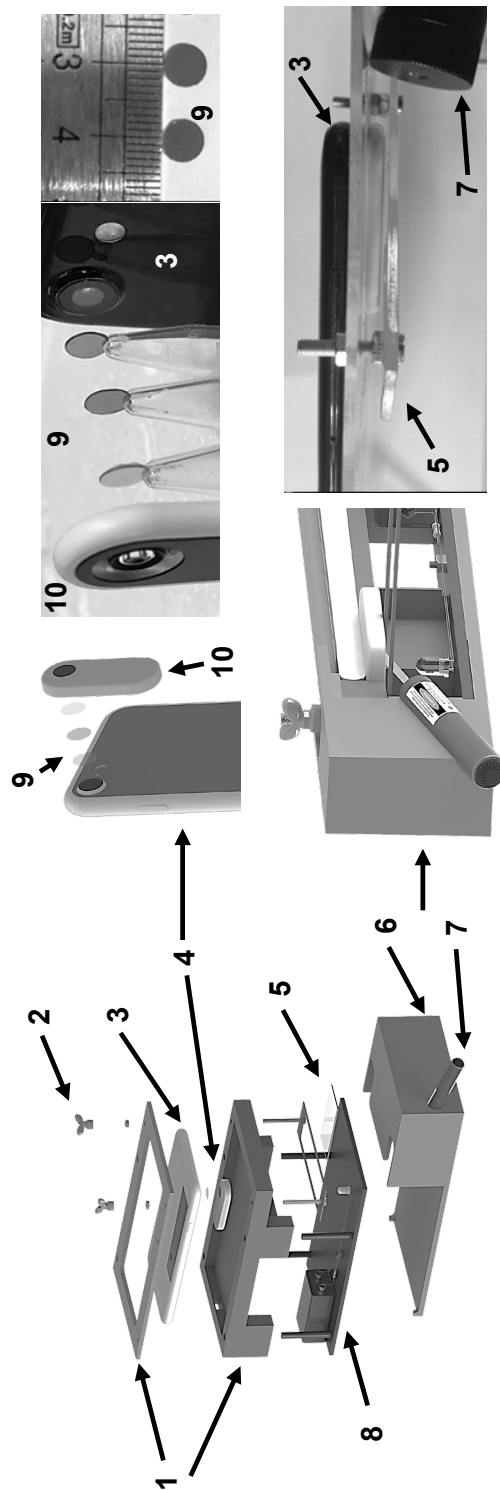


FIG. 1A

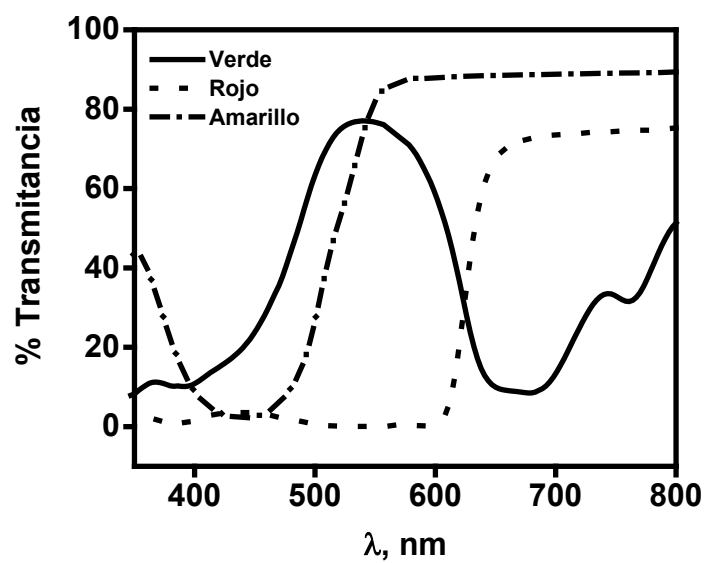


FIG. 1B

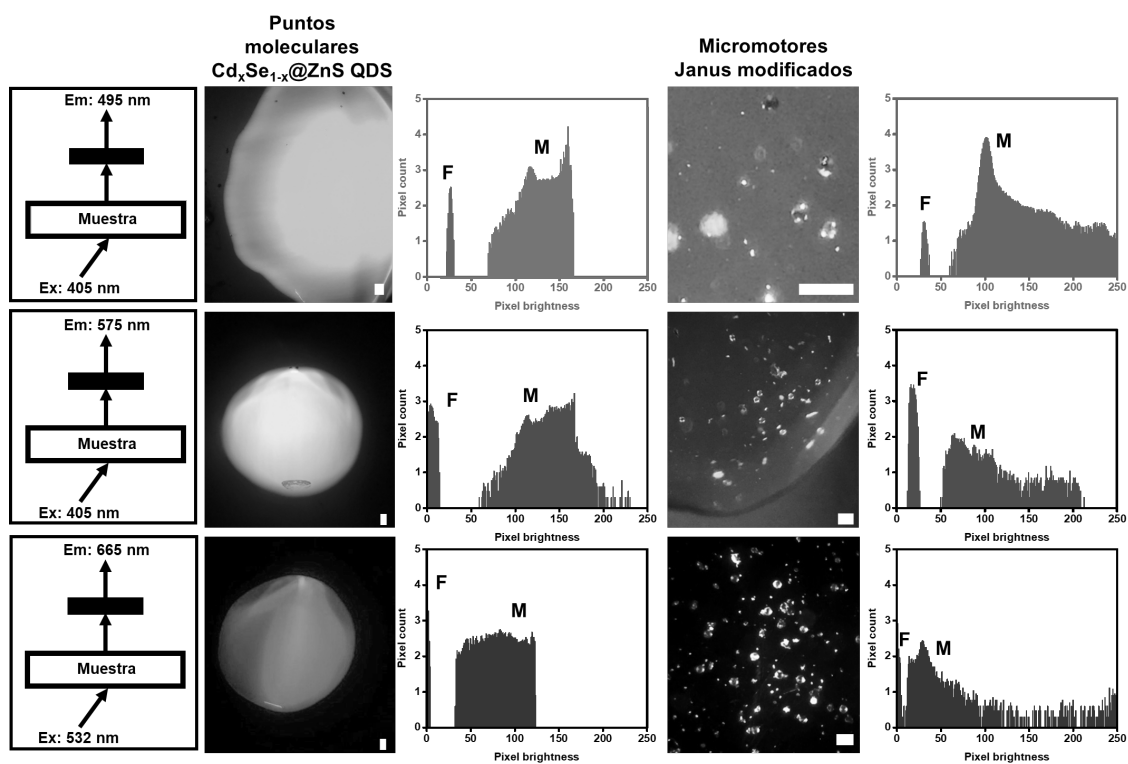


FIG. 2

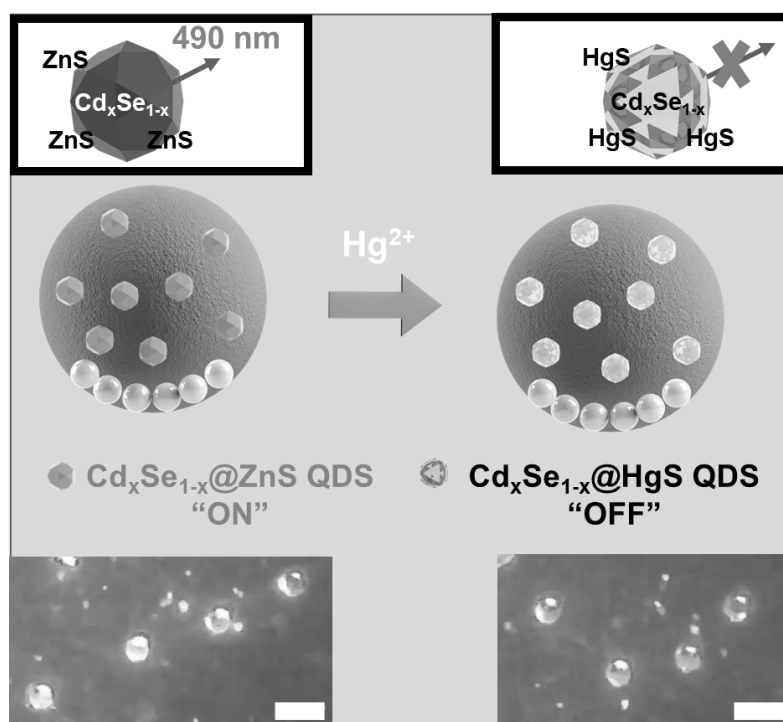


FIG. 3A

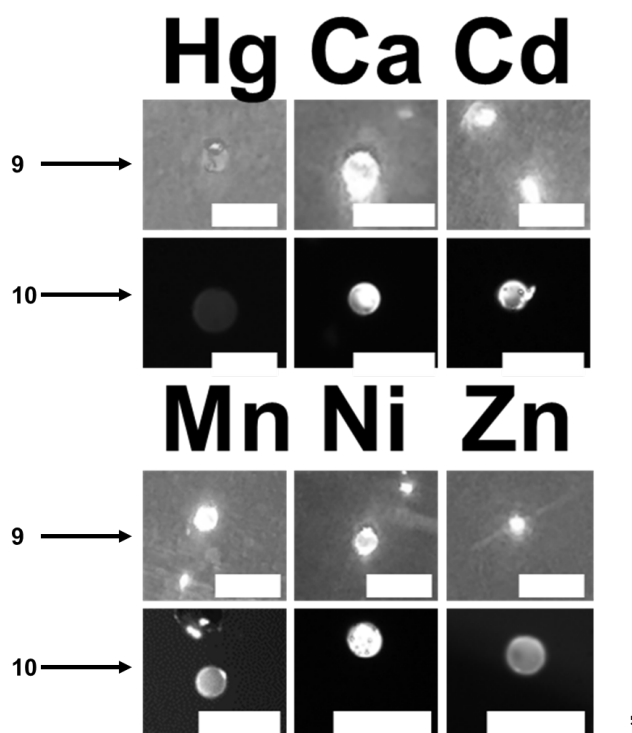


FIG. 3B

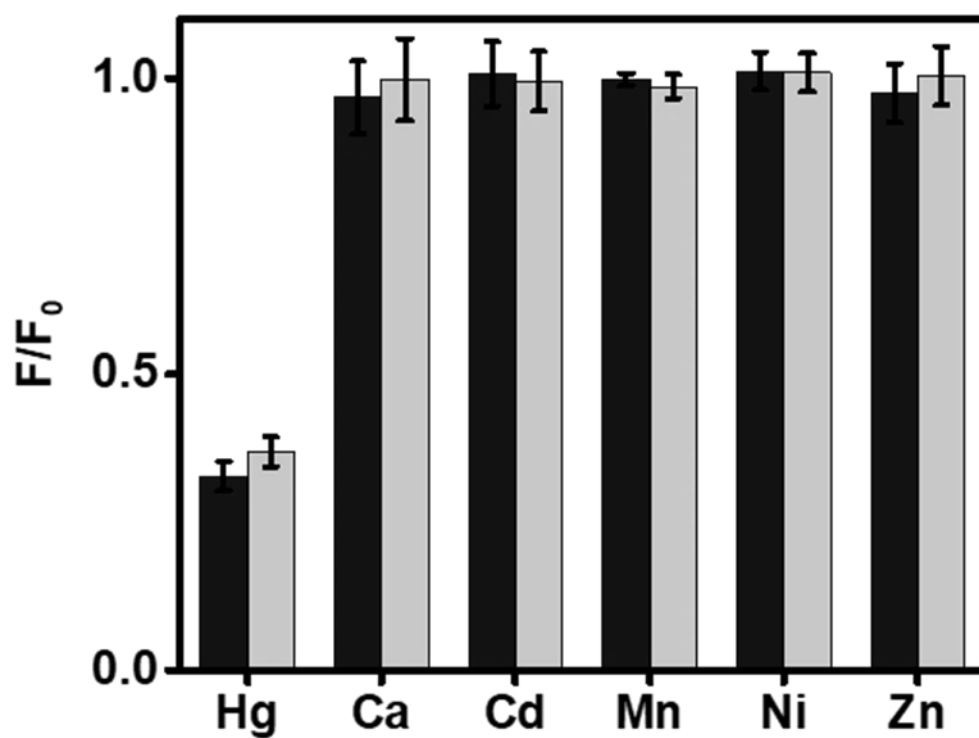


FIG. 3C

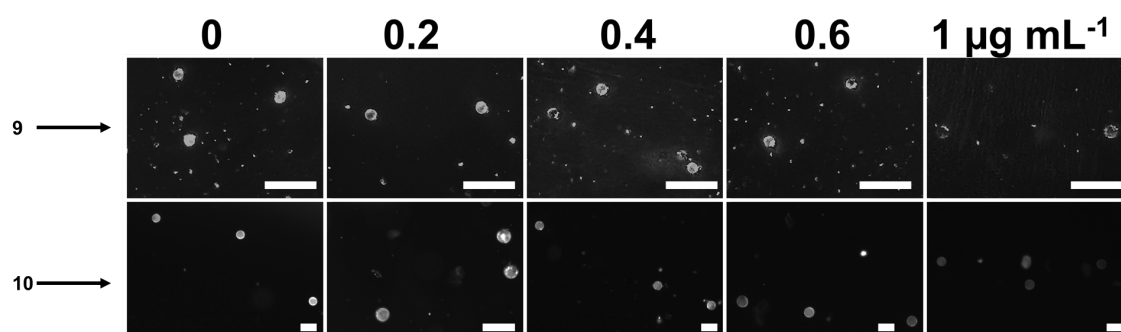


FIG. 3D

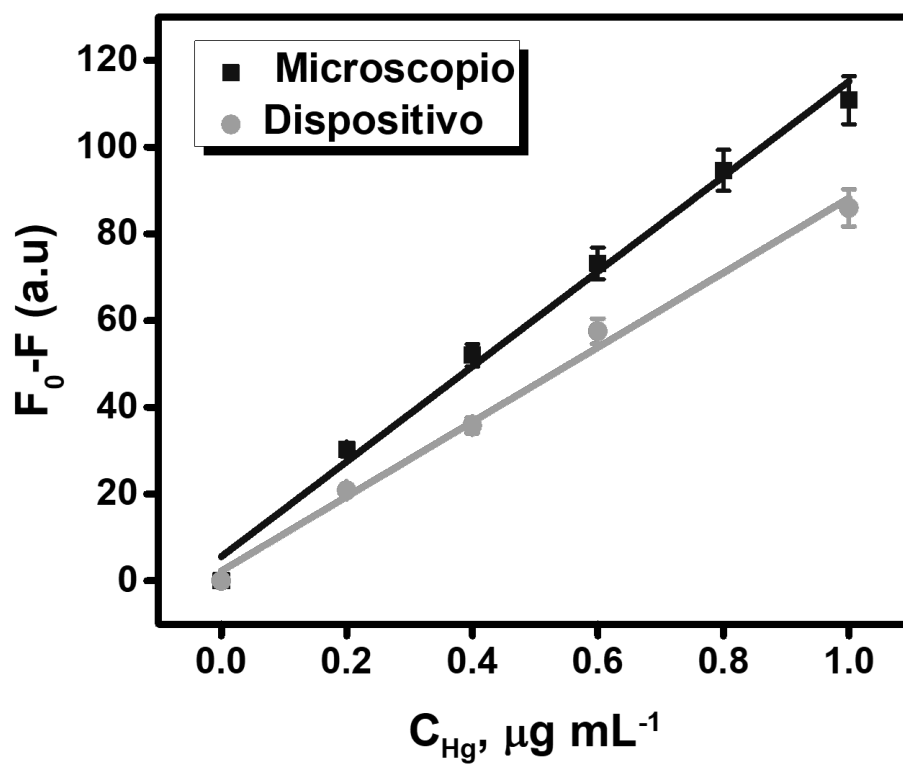


FIG. 3E

	LOD ($\mu g mL^{-1}$)	Intervalo de linealidad ($\mu g mL^{-1}$)
Microscopio	0.09	0.27-1
Dispositivo con teléfono inteligente integrado	0.08	0.24-1

FIG. 3F

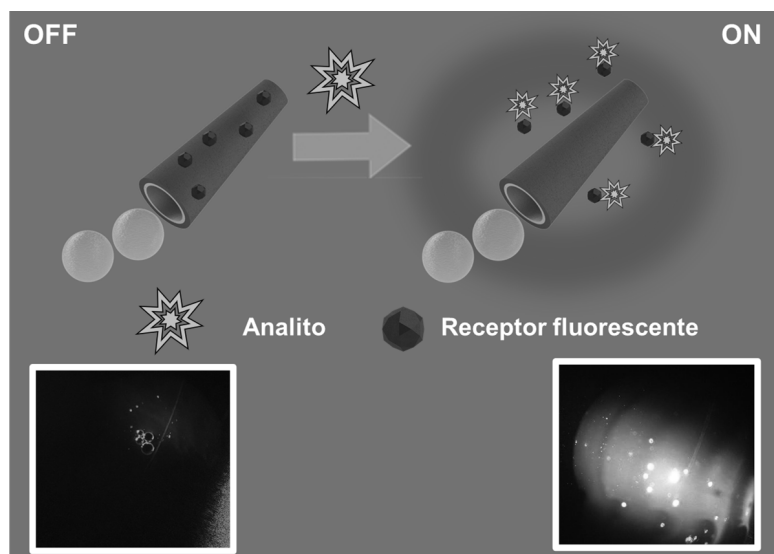


FIG. 4A

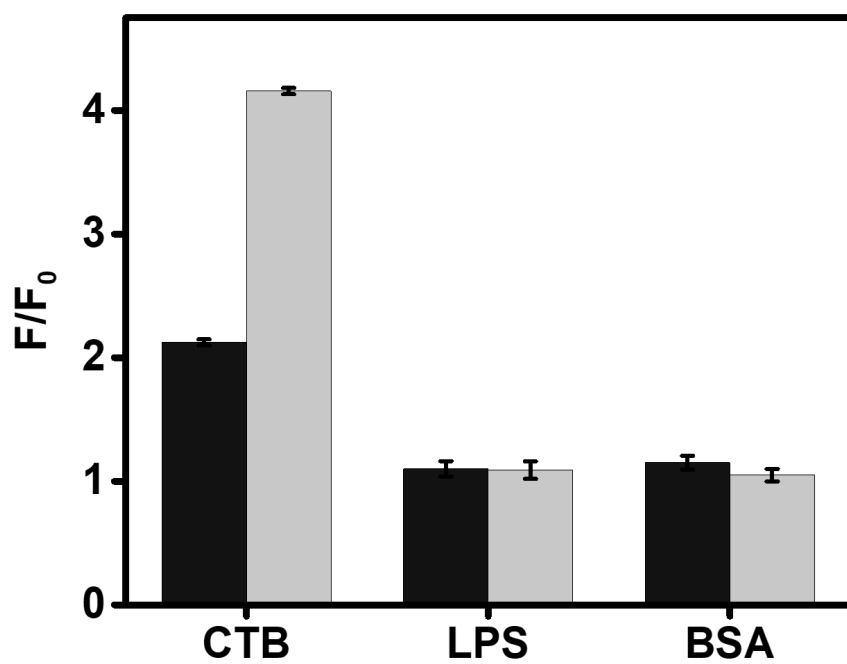


FIG. 4B

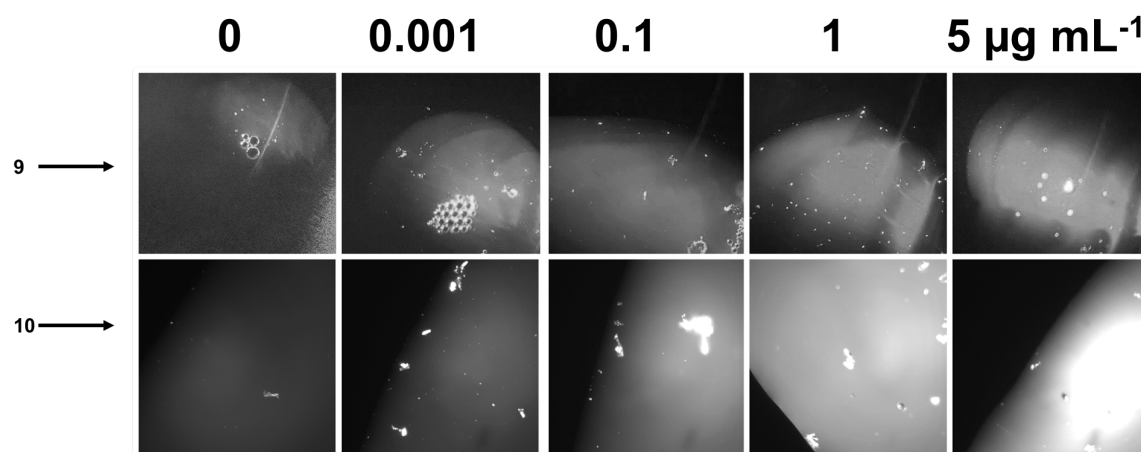


FIG. 4C

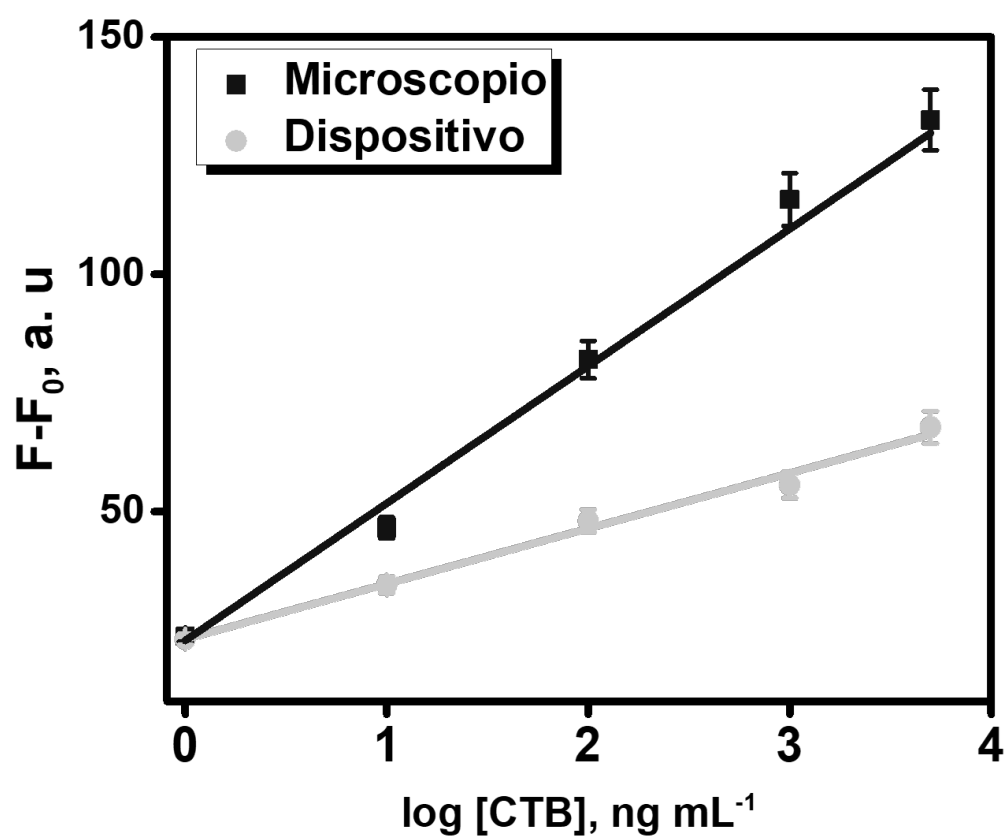


FIG. 4D

	LOD (ng mL ⁻¹)	Intervalo de linealidad (ng mL ⁻¹)
Microscopio	1.4	4.2-5000
Dispositivo con teléfono inteligente integrado	1.6	4.8-5000

FIG. 4E



- ②① N.º solicitud: 202130254
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2019213479 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL INC) 07/11/2019; resumen; párrafos [0003-0006, 0075, 0077, 0080-0086, 0090-0093, 0096, 0101, 0104]; reivindicaciones 1-5, 8, 16-19; figuras 1-5, 19.	1-4, 15, 16
Y		5-14
Y	KAISONG YUAN, VÍCTOR DE LA ASUNCIÓN-NADAL, BEATRIZ JURADO-SÁNCHEZ, AND ALBERTO ESCARPA. 2D Nanomaterials Wrapped Janus Micromotors with Built-in Multiengines for Bubble, Magnetic, and Light Driven Propulsion. Chem. Mater. 14-02-2020, Vol. 2020, N° 32, Páginas 1983-1992 [en línea][recuperado el 10-02-2022]. Recuperado de Internet <URL: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemmater.9b04873 >	5-10
Y	US 2014045179 A1 (WANG JOSEPH et al.) 13/02/2014; resumen, párrafo [0052], figura 1.	11-14
A	SUVARDHAN KANCHIA, MYALOWENKOSI I. SABELAA, PHUMLANE SELBY MDLULIA, INAMUDDIN, KRISHNA BISETTY. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. Biosensors and Bioelectronics 06/11/2017, Vol. 2018, N° 102, Páginas 136-139 [en línea][recuperado el 10/02/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566317307509?via%3Dihub >	1-16

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
14.02.2022

Examinador
S. Sánchez Paradinas

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/01 (2006.01)

B82Y15/00 (2011.01)

A61B5/00 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, B82Y, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, INTERNET