



núcleo de ingeniería biomédica  
facultades de medicina e ingeniería



universidad de la república

## Cámara de fotoluminiscencia, principios y oferta comparada

Santiago Reyes González

Monografía vinculada a la conferencia del Dr. Horacio Venturino sobre Instrumental para Laboratorio Clínico del 26 de mayo de 2009.

Email: santiagoreyesgonzalez@hotmail.com;

### Resumen

---

**Introducción** - En la presente monografía se detallará el funcionamiento de las cámaras de fotoluminiscencia, sus principios y principales componentes tanto eléctricos como químicos. Se dará a conocer cómo se genera el ciclo de trabajo de la cámara de fotoluminiscencia y las reacciones químicas que surgen durante la realización de la medida. Luego se realizará una oferta comparada de equipos de inmunodiagnósticos, que basen sus análisis en el principio de Electro-químio-luminiscencia (ECL).

**Metodología** - En primera estancia se tuvieron reuniones personales con el tutor de la presente monografía, donde se definió el tema y su extensión. Luego se estudió y buscó información sobre el funcionamiento de las celdas de fotoluminiscencia, se analizó el comportamiento de los distintos componentes durante la reacción electro-químio-luminiscente. Finalmente se solicitó información a distintos fabricantes de equipos de inmunodiagnostico para realizar una oferta comparada.

**Resultados** - Se llegó al resultado que la cámara de fotoluminiscencia está basada en la especificidad de las enzimas para seleccionar la sustancia a medir y mediante el agregado de sustancias electrosensibles e inyectando una tensión se genera la reacción fotoluminiscente deseada. Es un proceso cíclico en el cual las enzimas son re-utilizables no así los reactivos. En la oferta comparada se observó que la técnica de ECL no es una de las más utilizadas en equipos de inmunodiagnostico actualmente se utiliza principalmente la Químio-luminiscencia. Debido a esto es que sólo se compararon dos equipos de inmunodiagnostico, ambos poseen cámaras de fotoluminiscencias.

---

# 1. Introducción

La presente monografía mostrará en una primera instancia que son los biosensores, su principio de funcionamiento y principales características; para luego ingresar en el tema de las cámaras de fotoluminiscencia. Se detallará los principios del análisis por ECL, que elementos actúan durante los análisis, el ciclo de medida, para terminar dicha sección con la descripción del funcionamiento de la cámara de fotoluminiscencia. Por último se realizará la comparación entre dos equipos que tienen integrado en su estructura cámaras de fotoluminiscencias.

# 2. Principio de funcionamiento de los biosensores

Los biosensores forman parte de los sensores químicos, que son utilizados para detectar la presencia de sustancias y medir su cantidad en distintos medios. La base del funcionamiento de un biosensor está en la acción combinada de sus dos principales componentes, el bioreceptor y el transductor. El primero es un material de origen biológico capaz de reconocer una sustancia a determinar, llamada analito. En cuanto al transductor es un dispositivo sensible a los cambios que ocurren cuando el biosensor interactúa con el analito emitiendo una señal que puede ser medida. El bioreceptor y el transductor se encuentran unidos en un único componente, comúnmente son sondas o electrodos. Todos los procesos se desencadenan simultáneamente cuando la sonda o electrodo se pone en contacto con el analito, obteniéndose la medida en esta única operación. [1]

El biosensor es una o más enzimas puras, que forman parte de otro compuesto biológico (células, tejidos, etc). Las enzimas son proteínas sintetizadas por células capaces de catalizar distintas reacciones químicas. Las enzimas poseen una gran especificidad lo cual significa que cada enzima cataliza solamente un determinado tipo de reacción; éste es uno de los motivos de porqué la señal emitida por un biosensor es específica para un conjunto determinado de analitos sensibles a dicha acción catalítica de la enzima que compone el bioreceptor. Otra propiedad a destacar es su regenerabilidad, lo que hace referencia a que la enzima permanece incambiada luego de la reacción. [1]

La principal función del transductor es la de generar una señal medible de la reacción de la enzima con el analito. Lo que se hace generalmente es medir alguna propiedad derivada de dicha reacción química. Cambios en la cantidad de los compuestos químicos son detectados por los transductores generando una señal eléctrica cuantificable. Dicha señal da lugar a la medida de la cantidad de analito contenido en la sustancia a ensayar. [1]

Las principales características del método son:

- Medición directa del analito, no es necesario realizar manipulaciones intermedias como el preparado de soluciones y reactivos.
- Medición in situ, para llevar a cabo la medición no es necesario retirar el analito de su medio original.
- Medición original, no se generan cambios en el medio original.
- Medición instantánea, el resultado se obtiene en el mismo momento.
- Medición continua.
- Capacidad de reuso ilimitado, las enzimas se regeneran continuamente siendo capaces de actuar nuevamente luego de haber intervenido en una reacción. [1]

### 3. Principios del análisis por ECL

En la siguiente sección se pasará a detallar los principios que rigen el análisis por ECL (Electro-Quimio-Luminiscencia), como se mostró en la sección anterior para obtener la medida de la reacción se utilizan biosensores, particularmente en este caso se basa en técnicas de fotometría. La ECL es un proceso en el cual a partir de precursores estables se generan sustancias altamente reactivas (bioreceptor) en la superficie de un electrodo (transductor), estas sustancias reaccionan entre si generando luz. [4]

El origen del análisis de ECL está basado en el uso del complejo Rutenio II - tri bipyridil  $Ru(bpy)_3^{2+}$  y la Tripropilamina (TPA). La sustancia final quimioluminiscente es generada por una excitación eléctrica en la fase de detección. Para que ocurra la reacción quimioluminiscente el complejo de Rutenio debe ser excitado eléctricamente; esta reacción se logra aplicando un voltaje a los complejos inmunológicos (incluye el Rutenio), los cuales se encuentran adosados a micropartículas. Una de las ventajas que brinda este método es que al iniciar la reacción quimioluminiscente con electricidad es más controlable que el resto de los métodos. [4]

#### 3.1. Complejo de Rutenio

La reacción ECL usa quelato de rutenio como sustancia generadora de luz, es un complejo estable soluble en agua, con la particularidad que su ligando bipyridil pueden ser modificado por grupos reactivos para formar compuestos fololuminiscentes. Para que la tecnología ECL pueda ser aplicada a una gran variedad de analitos se usa el éster  $[Ru(bpy)_3^{2+}]$  N-hidrosuccinamida (Figura 1) el cual puede ser acoplado fácilmente a grupos de proteínas, haptenos <sup>1</sup> y ácidos nucleicos. [4] [5]

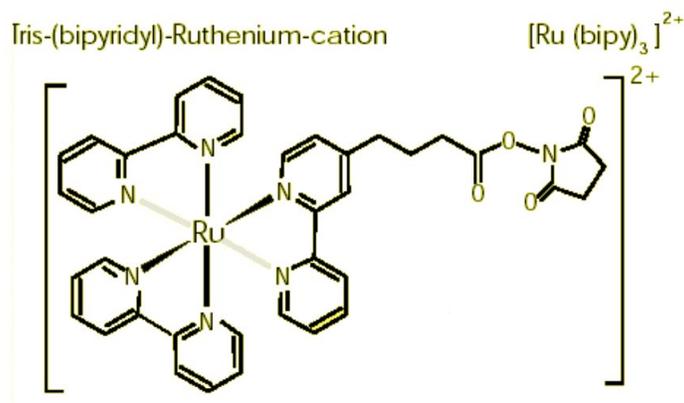


Figura 1: Complejo de Rutenio II - tri bipyridil

<sup>1</sup>Se define hapteno como una molécula pequeña que, por sí misma, no puede estimular la síntesis de anticuerpos, pero que sí puede combinarse con los anticuerpos, una vez formados. [6]

Las sustancias que están electroquímicamente activas son el complejo de Rutenio y la Tripropilamina, las cuales forman parte de las reacciones que llevan a la emisión de luz, ambas sustancias permanecen estables mientras no sean excitadas eléctricamente. En la superficie del electrodo de trabajo se genera la reacción ECL entre el complejo de Rutenio y la Tripropilamina como se muestra en la Figura 2. [4] [5]

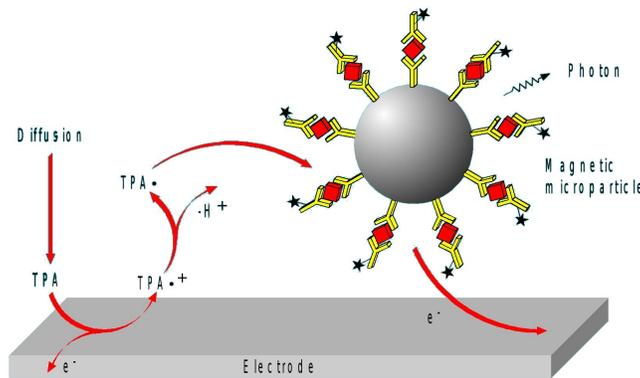


Figura 2: Reacción ECL en la superficie del electrodo

Al aplicar una tensión al electrodo de trabajo respecto al líquido que se desea medir se genera un campo eléctrico, activando la reacción entre las sustancias. La Tripropilamina es oxidada en la reacción química perdiendo un electrón, convirtiéndose en un catión radical intermedio, liberando un protón para formar un radical TPA; a la vez el complejo de Rutenio libera un electrón en la superficie del electrodo pasando a ser un catión  $[Ru(bpy)_3^{3+}]$ ; dicho catión va a reaccionar con el radical TPA generando la reacción quimioluminiscente. [2] [3] [4] [5] Luego de la reacción quimioluminiscente se reduce nuevamente a  $Ru(bpy)_3^{2+}$ , pasando a su estado no excitado emitiendo un fotón a 620nm, generando el ciclo de acción que se muestra en la Figura 3. El TPA es consumido durante la reacción y no se regenera por lo cual debe ser inyectado nuevamente en la reacción. La reacción quimioluminiscente es controlada por la difusión de TPA y la cantidad del complejo de Rutenio presente en la sustancia. A medida que el TPA se va agotando la luz emitida decae. [2] [3] [4] [5]

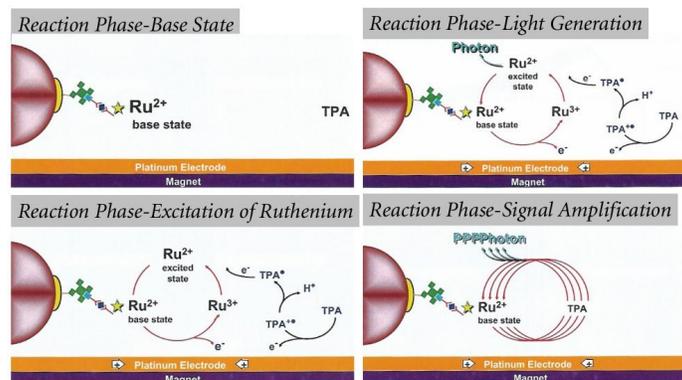


Figura 3: Ciclo de reacción ECL

## 4. Celdas de medida ECL

Las celdas de medida comunmente utilizadas para inmunodiagnóstico en la reacción ECL, son biosensores basados en la catalización que llevan a cabo las enzimas como se detalló en la sección anterior. Para poder llevar a cabo dicha reacción los reactivos deben poseer anticuerpos<sup>2</sup> “anti” el analito que se desea medir llamado también antígeno<sup>3</sup>, la reacción que llevan a cabo se denomina antígeno - anticuerpo. El funcionamiento de la celda de medida (Figura 4) se basa en la especificidad y altísima sensibilidad de la reacción antígeno - anticuerpo. Dichos anticuerpos son adheridos a micropartículas las cuales se encunaran recubiertas de biotina-estreptovidina y además están marcados con quelato de Rutenio. [2] [3] [4] [5]

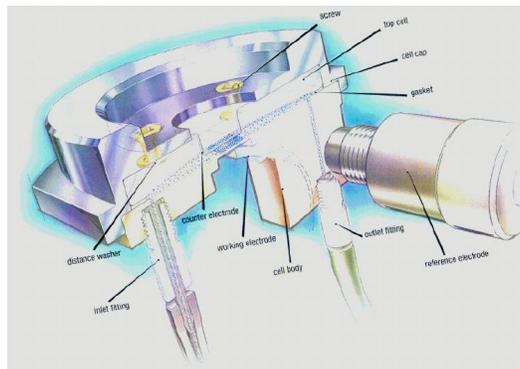


Figura 4: Construcción de la celda de medición ECL

El sistema de la celda de detección de ECL es del tipo “de flujo a través”. Los productos de la reacción entran a la celda, luego un imán se ubica temporalmente bajo el electrodo de trabajo de manera que las micropartículas que contienen los complejos antígeno - anticuerpo quedan uniformemente distribuidos sobre el electrodo de trabajo (Figura 5).

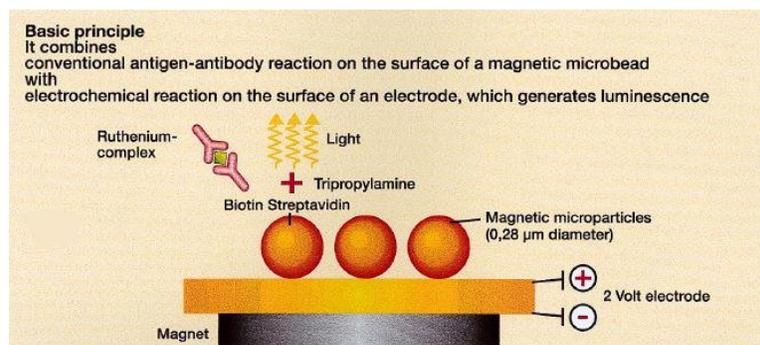


Figura 5: Imán en la camara de medición

<sup>2</sup>Anticuerpo: “Sustancia que se forma en los fluidos del cuerpo al inyectar en éstos sustancias perjudiciales, cuyos efectos son así anulados, como sucede con las antitoxinas.” [7]

<sup>3</sup>Antígeno: “Cuerpos extraños (moléculas grandes, virus, etc) que, inyectados en un organismo, dan origen a al formación de anticuerpos, uniéndose a los cuales producen sustancias inocuas.” [7]

Para eliminar los excedentes de los reactivos (muestra y micropartículas no unidas) se hace pasar una sustancia limpiadora. Seguido se remueve el imán y se aplica un voltaje entre el líquido y el sensor de trabajo (Figura 6), el cual tiene depositadas sobre él las micropartículas recubiertas con complejos antígeno - anticuerpo.

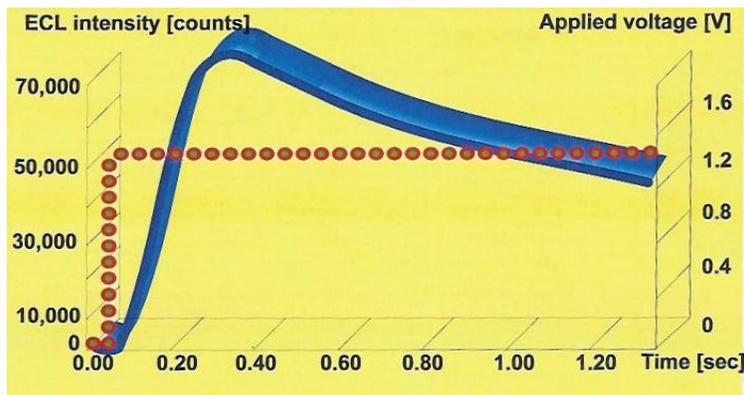


Figura 6: Gráfica del disparo eléctrico y respuesta luminosa

El líquido presenta una tensión negativa con respecto al sensor de trabajo, iniciando la reacción ECL, donde la luz emitida es medida por un tubo fotomultiplicador (Figura 7). Terminada la medición, las partículas paramagnéticas son lavadas de la superficie del sensor de trabajo. Aplicando un potencial se regenera la superficie de la celda de trabajo. [2] [3] [4] [5]

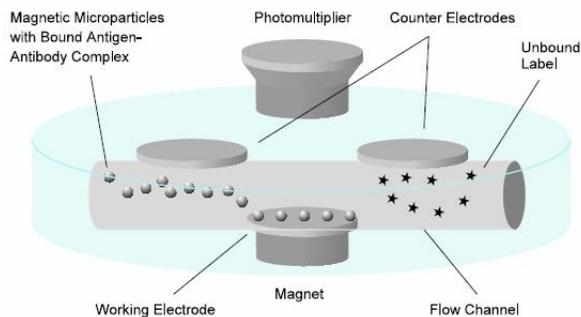


Figura 7: Fotomultiplicadot

## 5. Oferta comparada

Se pasará a comparar los distintos equipos que utilizan esta tecnología a lo largo del mundo, evaluando cualitativamente y cuantitativamente sus descripciones. De las mismas se tomaran los datos más relevantes para realizar el análisis. En la siguiente tabla se muestra los datos que nos brindan los fabricantes.

Cuadro 1: Tabla de comparación

	Autolia -12/48 (China Medical) [8]	Modular E170 (Roche) [9]
Celdas de ECL	1	2
Test por Hora	48	170
Sistema automático de medición	Si	Si
Ensayos simultáneos	70	300
Canal para muestras de emergencia	Si	Si
Volumen mínimo de muestras( $\mu$ L)	10	10
Recarga continua de consumibles	Si	Si
Calibración automática	Si	Si
Equipo transportable	Si	No

Los precios de dichos equipos no se encuentran disponibles para compradores particulares, generalmente estos equipos son suministrados por las compañías que los representan en los distintos países, los mismos se financian con la compra de insumos y gastos del mantenimiento preventivo que se realizan usualmente semestralmente. Se consiguieron precios aproximados de las cámaras de ECL, las mismas cuestan alrededor de U\$S 2100 en el mercado local, en los países fabricantes el precio de las mismas es aproximadamente U\$S 1000. De la tabla de comparación se puede observar que cuantitativamente los equipos se diferencian en la cantidad de ensayos por hora y ensayos simultáneos que se pueden realizar; resultando más conveniente el equipo Modular E de Roche (en ambos atributos). Sin embargo cualitativamente los equipos Autolia -12/48 y Modular E170 ofrecen los mismos niveles de automatización; la diferencia se encuentra en la facilidad de movilidad que posee el Autolia con respecto al Modular E170 debido a su reducido tamaño y contar con ruedas en su superficie que facilitan su transporte.

## 6. Conclusiones

El método de Electro-quimio-luminiscencia se basa en los principios de los biosensores y sus bases surgen de las técnicas de fotometría. Dicho método es relativamente nuevo pero ha llegado a ocupar gran parte del mercado debido a su alta efectividad y bajo costo de insumos, debido principalmente al ciclo de actividad que llevan a cabo las enzimas (las cuales pueden ser reutilizadas), solamente se consume TPA el cual es inyectado al inicio de cada medida.

En la última sección se enfocó en el análisis de dos equipos que utilizan el método de Electro-quimio-luminiscencia para realizar ensayos inmunológicos. Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos, dependiendo de la utilización y espacio que se tenga para la colocación del equipo.

## Agradecimientos

Al Dr. Horacio Venturino que muy amablemente me brindó materiales y respondió consultas para la realización de la presente monografía.

## Referencias

1. Franco Simini, *Ingeniería Biomédica perspectivas desde el Uruguay*, Departamento de Publicaciones de la Universidad de la República, 2007.
2. Horacio Venturino, *Descripción de la reacción de Electro-Quimio-Luminiscencia en los Elecsys*, 2009.
3. Dr. Horacio Venturino *Sensores y celdas de medición de los Analizadores de Laboratorio clínico*, NIB, 2009.
4. Dr. Horacio Venturino, *Tecnología ECL*, documento interno de Roche Diagnostics, Global Service Support sobre Tecn. ECL en sus analizadores de Inmunodiagnóstico, 2009.
5. Global Service Support of Roche, *Global Service Support*, documento interno de Roche Diagnostics, 2009
6. Ivan Roitt, *Inmunología esencial*, Blackwell Scientific Publications, 1979.
7. José R. Barcelo, *Diccionario terminológico de química*, Editorial Alhambra, 1976.
8. China Medical, *Model Autolia - 12/48*, [http://www.chinameditech.com/eng/product/model\\_autolia1248.htm](http://www.chinameditech.com/eng/product/model_autolia1248.htm), 2009.
9. Roche Diagnostics, *Productos Modular analytics 170*, [http://www.roche-diagnostics.com.ar/productos-servicios/equipos/modular\\_2.html](http://www.roche-diagnostics.com.ar/productos-servicios/equipos/modular_2.html), 2009.