

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 541**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2009** **E 09730632 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 2271938**

54 Título: **Método y aparato para la amplificación de la quimioluminiscencia electrogenerada por nanopartículas**

30 Prioridad:

11.04.2008 US 123780 P

11.04.2008 US 123943 P

21.04.2008 US 124935 P

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

28.04.2014

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)

1 University Station, A5300

Austin, TX 78712-0162, US

72 Inventor/es:

FAN, FU-REN F.;

BARD, ALLEN J. y

XIAO, XIAOYING

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 457 541 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).

DESCRIPCION

Método y aparato para la amplificación de la quimioluminiscencia electrogenerada por nanopartículas

Antecedentes

Las propiedades físicas de nanopartículas ("NPs"), p.ej., gran relación superficie/volumen, elevada energía superficial, ductilidad incrementada después de carga de presión, mayor dureza, mayor calor específico, y similares, han conducido a mayores aplicaciones en la industria dirigida a los materiales y la ciencia de materiales. Por ejemplo, se ha usado una variedad de NPs metálicas para catalizar numerosas reacciones.

El intervalo de tamaño de NPs de menos de 1 nm a aproximadamente 100 nm y la configuración de la banda de energía electrónica son una propiedad dependiente del tamaño, que a su vez puede afectar a las propiedades físicas y químicas. Una distinción fundamental entre los NPs y materiales a granel es que la fracción de átomos superficiales y el radio de curvatura de la superficie de NPs es comparable con la constante reticular. Como resultado, los catalizadores nanoestructurados generalmente tienen una actividad catalítica mayor comparada con sus análogos basados en materiales a granel. Se conocen varios métodos de formación de NPs por el experto en la técnica e incluyen la formación por combinación de átomos (o radicales y moléculas más complejos) y por dispersión de materiales a granel, p.ej., evaporación térmica, pulverización iónica, reducción en solución, reducción en microemulsiones, y condensación.

Se han descrito partículas coloidales usadas en matrices de detección. Estos son sensores químicos para detectar analitos en fluidos via matrices que tienen una pluralidad de regiones no conductivas y regiones conductivas alternantes de materiales NP conductivas. La variabilidad de la sensibilidad química de sensor a sensor se ha descrito que se proporciona al variar cualitativamente o cuantitativamente la composición de las regiones conductivas y/o no conductivas. Guo et al., describe el comportamiento de la quimioluminiscencia electrogenerada (ECL por sus siglas en inglés) de la lucigenina en un electrodo de vidrio en presencia de nanopartículas de platino dispersadas en una solución acuosa usando voltamperometría cíclica convencional. La voltamperometría cíclica convencional reveló que en presencia de las nanopartículas de platino se observaba un nuevo pico de ECL que surgía en la región de potencial de evolución de hidrógeno además del pico de ECL convencional observado en ausencia de nanopartículas de platino.

Xiao et al., J Am Chem Soc, 129, 9610-9612 (2007) describen un método para observar colisiones de nanopartículas metálicas únicas en un electrodo electroquímicamente. La colisión se caracteriza por la corriente generada a través de una reacción catalizada por partículas de un indicador presente en la solución produciendo un único perfil corriente-tiempo que es una función de la interacción de las partículas con la superficie del electrodo.

Wilson et al., Electroanalysis, 13 (13), páginas 1083-1092, (2001) describe una comparación de la electroquimioluminiscencia de un éster de acridina (2',3',6'-trifluorofenil-10-metilacridan-9-carboxilato), luminol, y un quelato de rutenio (tris 2,2'-bipiridil de rutenio) usando electrodos de óxido de estaño e indio transparentes (ITO por sus siglas en inglés).

Chovin et al., Meas. Sci. Technol. 17, 1211 (2006) describen una micromatriz de nanosensores para electroquimioluminiscencia (ECL) por detección remota, que se crearon en la cara distal de haces de fibra óptica coherentes al adaptar las metodologías de sonda óptica de campo cercano y nanoelectrodos. El procedimiento de fabricación permite la producción de micromatrices de alta densidad de nanosensores donde cada apertura óptica está rodeada por un electrodo de nanoanillo de oro.

Henglein et al., J. Phys. Chem., 99 (38), 14129-14136 (1995) describen el espectro de absorción y algunas reacciones químicas de platino coloidal en solución acuosa y describen que los coloides pueden tender a formar agrupaciones cuyo espectro de absorción es bastante plano.

Los sensores electroquímicos de partícula única, que emplean un dispositivo electroquímico para detectar partículas únicas, también han sido descritos. También han sido descritos métodos para usar tal dispositivo para lograr una alta sensibilidad para detectar partículas como bacterias, virus, agregados, inmunocomplejos, moléculas, o especies iónicas.

Sumario

La presente aplicación se refiere en general al campo de las nanopartículas ("NPs"), y en particular, se refiere a instrumentos, métodos y reactivos para amplificar una señal de quimioluminiscencia electrogenerada ("ECL") de una reacción catalítica usando NPs. Se han reconocido las dificultades al generar, localizar, y caracterizar una NP única, especialmente en la escala nm y al medir la corriente muy pequeña e intensidad de ECL generadas por estas reacciones con electrodo sobre NPs. La presente tecnología puede aplicarse potencialmente para determinar distribuciones de tamaño de partículas, porosidad de la película superficial, y como una técnica electroanalítica muy sensible.

La adsorción de otras especies en la matriz sobre la superficie del electrodo puede interferir al pasivar el electrodo, como lo puede hacer una adsorción no específica. El problema puede solventarse típicamente al usar sistemas electroquímicos limpios (célula y electrolito), pretratamiento de muestra, y/o al modificar las superficies del electrodo auxiliar.

El presente método y aparato pueden emplearse para detectar un evento único de colisión de nanopartícula con un electrodo mediante esquemas de reacción de quimioluminiscencia electrogenerada ("ECL"). Este evento único de colisión de nanopartícula produce una ráfaga de luz que puede tener implicaciones analíticas altamente sensibles. Esto ocurre típicamente al tomar una muestra líquida, que incluye una pluralidad de nanopartículas activas conductivas o redox y una pluralidad de restos de quimioluminiscencia electrogenerada ("ECL"), en contacto con uno o más electrodos en una cámara de muestra. Mediante estas reacciones, se pueden llevar a cabo grandes factores de amplificación de la intensidad de ECL asociada con estos eventos. Por ejemplo, la oxidación de tri-n-propilamina ("TPrA") en presencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ocurre rápidamente en una superficie de nanopartícula de platino, pero a una velocidad mucho más lenta en una superficie de electrodo de estaño e indio ("ITO") dentro de una cierta ventana de potencial. Como resultado, cada colisión de una partícula en la superficie del electrodo produce un único perfil de ECL-tiempo que se correlaciona con el tamaño de partícula, el tiempo de residencia de la partícula, y la naturaleza de la interacción de la partícula con la superficie del electrodo. Esta tecnología puede usarse para determinar distribuciones de tamaño de nanopartículas, para examinar cinéticas de transferencia de electrón, y especialmente como una técnica electroanalítica muy sensible. Podría tener aplicaciones en nanotecnología, biotecnología y análisis clínico como un método analítico sencillo, de bajo coste, rápido, y ultra sensible al explorar y detectar eventos únicos de unión entre biomoléculas (hibridación de ADN, interacciones entre proteína-ADN, anticuerpo-antígeno, moléculas pequeñas de proteína). Podrían ser posibles niveles de detección de molécula única.

La presente aplicación proporciona un método y aparato, que pueden usarse para observar la ECL generada durante las colisiones de NPs sencillas en un electrodo. El método y aparato pueden proporcionar información de procesos electroquímicos en NPs únicas, al igual que la base de los métodos electroanalíticos altamente sensibles. Las NPs han mostrado tener una gran variedad de aplicaciones en electrónica, óptica, catálisis, y biotecnología.

En una realización, la presente aplicación proporciona un método y dispositivo para analizar una muestra en una cámara de muestra. En esta realización, el presente método puede incluir típicamente la adición de una o más NPs activas conductivas o redox a una muestra líquida en una cámara de muestra, y observar la corriente y/o ECL generadas por la interacción de las NPs activas conductivas o redox y la muestra líquida usando uno o más electrodos. Típicamente, la propiedad electroanalítica observada es una amplificación de la intensidad de ECL de una reacción con electrodo catalizada por las NPs activas conductivas o redox. La propiedad observada, sin embargo, no está limitada a una corriente y puede incluir otros parámetros, como una emisión de ECL, otros parámetros eléctricos, o una cualquiera de sus combinaciones.

El dispositivo descrito en la presente aplicación incluye comúnmente una célula electroquímica conectada a un aparato de medición que incluye un aparato electroquímico y un detector de fotones. La célula electroquímica (véase, p.ej., dispositivo ejemplar descrito en la Figura 16) tiene típicamente uno o más electrodos en una cámara de muestra y un aparato electroquímico en comunicación con los electrodos. Se pueden inyectar una o más NPs activas conductivas o redox en una muestra en la cámara de muestra. Las NPs inyectadas pueden interactuar con la muestra y generar uno o más fotones que pueden observarse con un detector de fotones. El dispositivo puede contener opcionalmente un indicador en una solución. Además, la célula electroquímica puede tener una dimensión en la escala de nanómetros e incluye ultramicroelectrodos ("UMEs").

La presente aplicación incluye un kit para analizar uno o más analito(s) químico(s) que tienen al menos una NP, al menos un indicador químico, al menos un electrodo, y un aparato de medición que lee una o más corrientes y propiedades de ECL generadas por las interacciones entre las NP(s), los electrodo(s) y los analito(s) químico(s).

En contraste con otras tecnologías de amplificación, tal mejora óptica y eléctrica, el presente esquema de amplificación de ECL basado en nanopartículas es particularmente ventajoso. Los grandes factores de amplificación implicados pueden permitir observar un evento único de colisión de nanopartícula. Al estudiar un evento de colisión individual, los múltiples procedimientos implicados en tal evento único puede explorarse y analizarse más, como una concentración de partículas relacionada con la frecuencia, tamaño de partícula relacionado con la amplitud y la naturaleza de la partícula que se une a las superficies del electrodo, y similares. La amplificación catalítica usando una monocapa de nanopartículas ya ha sido ampliamente demostrada en biosensores y biotecnología. Por primera vez, se ha demostrado la amplificación de ECL en una nanopartícula única. Los métodos habituales usados para estudiar el evento único de transferencia de electrón en una partícula única, como SEM (microscopía electrónica de barrido por sus siglas en inglés) y/o TEM (microscopía electrónica de transmisión por sus siglas en inglés), son técnicas caras y lentas. A pesar de esto, tales técnicas han sido ampliamente utilizadas para estudiar distribuciones de tamaño de partícula. La dispersión de luz también se ha usado para esta aplicación. La presente aplicación tiene el potencial para determinar la distribución de tamaño y en muchos casos la identidad química de las nanopartículas. La microscopía de fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales y espectroscopia vibracional y Raman mejorada son muy útiles en biotecnología para detectar y escanear la unión entre biomoléculas. La técnica de ECL puede detectar tales interacciones en el nivel de molécula única y evento único de transferencia electrónica con un aparato más simple y mucho menos caro. El método presente tiene la ventaja que no se usa una fuente de luz, por

lo que la luz dispersa y la interferencia de la emisión de las impurezas luminiscentes no son un problema. A menudo también es más conveniente que otros métodos quimioluminiscentes, ya que la excitación electroquímica puede permitir el control temporal y espacial.

En muchas realizaciones, las nanopartículas ("NPs") tienen al menos una dimensión que no es mayor de aproximadamente 200 nm, más comúnmente no más de aproximadamente 100 nm y, en algunas realizaciones, al menos una dimensión no es mayor de aproximadamente 50 nm. Por ejemplo, el material de nanoestructura puede ser una nanopartícula ("NP") en la cual ninguna dimensión es mayor de aproximadamente 100 nm y, en algunos casos, no mayor de 20 nm. Otros ejemplos incluyen nanocristales ("NCs") en los cuales típicamente al menos dos y, a menudo tres, dimensiones no son más de aproximadamente 200 nm y a menudo no más de aproximadamente 50 nm. Otras realizaciones pueden incluir nanocintas ("NBs" por sus siglas en inglés), que tienen una morfología larga, estirada y como una cinta, con un espesor de más de aproximadamente 200 nm. Tales nanobelts pueden tener anchos de aproximadamente 200 a 1000 nm y longitudes de hasta aproximadamente 5 a 15 μm y típicamente tiene una relación ancho-espesor de aproximadamente 5 a 10.

Breve descripción de los dibujos

Para un entendimiento más completo de las características y ventajas del presente método y aparato, la referencia se hace ahora a la sección de descripción detallada junto con las figuras acompañantes y en las que:

La Figura 1 es un esquema de la colisión de NP de Pt /evento de generación de ECL.

La Figura 2 muestra voltamogramas cíclicos (2A y 2C) y curvas (intensidad de ECL versus potencial) (2B y 2D) en una solución que contiene $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y tri-n-propilamina ("TPPr") en un electrodo de Pt macro (2A y 2B) o ITO (2C y 2D).

La Figura 3 muestra un transiente de corriente (3A) y curva (intensidad de ECL versus tiempo) (3B) en un electrodo de disco de Pt macro.

La Figura 4 muestra voltamogramas cíclicos ("CVs; 4A) y curvas (intensidad de ECL (kilocuentas por segundo, "kcps") versus potencial) (4B) en un electrodo ITO en soluciones que contienen concentraciones diferentes de NPs de Pt: 0 nM de NPs de Pt "NEGRO"; - 1 nM de NPs de Pt "ROJO"; y - 2 nM de NPs de Pt "AZUL".

La Figura 5 es una gráfica de transientes de corriente individuales (5A y 5C) y registros (intensidad de ECL versus tiempos) (5B y 5D) en el electrodo ITO antes y (5A y 5B) y después (5C y 5D) de la inyección de una solución coloidal 2 nM de Pt. El potencial ITO fue aumentado escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE (electrodo saturado de calomelanos por sus siglas en inglés) para una duración de 4 segundos. La Figura 5B cuentas totales de fotones = 8428. La Figura 5D cuentas totales de fotones = 9968. La Figura 5E muestra una imagen TEM de NPs de platino representativo, que tienen un diámetro medio de ~ 4 nm.

La Figura 6 muestra transientes de ECL (6A y 6B) y las funciones de densidad de probabilidad correspondientes ("PDFs" por sus siglas en inglés) (6C y 6D) de transientes de ECL en el electrodo ITO antes (6A y 6C) y después (6B y 6D) de la inyección de una solución ~ 2 nM de NP de Pt. El potencial ITO fue aumentado escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE para una duración de 4 segundos. La Figura 6A cuentas totales de fotones = 8428. La Figura 6B cuentas totales de fotones = 9968.

La Figura 7 muestra las curvas (intensidad de ECL versus tiempos) (7A, 7B, y 7C respectivamente) y las correspondientes PDFs (7D, 7D, y 7F respectivamente) y sus distribuciones Gaussianas descompuestas en el electrodo ITO a tres concentraciones diferentes de NP de Pt coloidales (0 nM de NPs de Pt (7A y 7D); - 1 nM de NPs de Pt (7B y 7E); y - 2 nM de NPs Pt (7C y 7F)) pero casi a las mismas concentraciones de la especie indicadora y coreactante. El potencial ITO fue aumentado escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE para una duración de 4 segundos. La Figura 7A cuentas totales de fotones = 8428. La Figura 7B cuentas totales de fotones = 9247. La Figura 7C cuentas totales de fotones = 9968.

La Figura 8 muestra gráficas de registros diferentes (intensidad de ECL versus tiempos) resultantes de concentraciones diferentes de las especies indicadoras (concentración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$: 1,2 μM (8A), 2 μM (8B), 4 μM (8C) y 6 μM (8D)) pero casi las mismas concentraciones de NPs de Pt (concentración de NPs Pt: $\sim 1,6$ nM (8A, 8B, 8C) y - 2 nM (8D)) y coreactante en el electrodo ITO. Es= 0,91 V para las Figuras 8A-8D. Figura 8B cuentas totales de fotones = 1913. Figura 8B cuentas totales de fotones = 4538. Figura 8C cuentas totales de fotones = 9781. Figura 8D cuentas totales de fotones = 17166.

La Figura 9 ilustra las PDFs y sus distribuciones multinormales descompuestas, Figuras 9A, 9B, 9C, y 9D, correspondientes a las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) mostradas en Figuras 8A, 8B, 8C y 8D, respectivamente.

La Figura 10 es una gráfica que ilustra los transientes de corriente (10A, 10B, 10C) y los correspondientes registros (10D, 10E, 10F) en el electrodo ITO con NPs de Pt ~ 1 nM a diferentes potenciales de paso aplicados: 0,71 V versus

SCE (10A, 10D), 0,81 V versus SCE (10B, 10E) y 1,11 V versus SCE (10C, 10F). La Figura 10D (ECL + oscuro) cuentas= 2222. Figura 10E (ECL + oscuro) cuentas= 5216. Figura 10F (ECL + oscuro) cuentas= 5821.

La Figura 11 muestra las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) mostradas en la Figura 10 (Figura 11A= Figura 10D; Figura 11B = Figura 10E; y Figura 11C = Figura 10F) y sus correspondientes PDFs (11D, 11E, y 11F respectivamente) y las distribuciones multi-Gaussianas descompuestas. Figura 11A (ECL + oscuro) cuentas= 2222; ES= 0,71 V. Figura 11B (ECL + oscuro) cuentas= 5216; Es= 0,81 V. Figura 11C (ECL + oscuro) cuentas= 5821; Es= 1,11 V.

La Figura 12 son PDFs de los transientes de ECL en el electrodo ITO resultantes de dos concentraciones diferentes de las especies indicadoras, Ru(bpy)₃²⁺, (3 μm (12A) y 6 μm (12B)) en ausencia de NPs de Pt. En la Figura 12A, Es= 0,91 V versus SCE; media, p= 33 cuentas; y varianza, σ= 6,5. En la Figura 12B, Es= 0,91 V versus SCE; μ= 69 cuentas; σ= 7.

La Figura 13 muestra ejemplos de funciones de densidad espectral ("SDFs" por sus siglas en inglés) (13C y 13D) de los transientes de ECL (13A y 13B) resultantes de dos concentraciones de NP de Pt coloidal (0 nM de NPs de Pt (13A y 13C); - 2 nM de NPs de Pt (13B y 13D)) como se han mostrado en la Figura 7 (Figura 13A= Figura 7A; Figura 13B= Figura 7C), ilustrando las fluctuación de la intensidad de ECL en el campo de frecuencia causado por las NPs de Pt. Es= 0,91 V versus SCE para Figuras 13A-13D para Figura 13D, MCS (Multi Channel Scaling) dwt= 15,6 ms. Figura 13A cuentas totales de fotones = 8428. Figura 13B cuentas totales de fotones = 9988.

La Figura 14 ilustra ejemplos de funciones de correlación de tiempo ("TCFs" por sus siglas en inglés) de los transientes de ECL resultantes de tres concentraciones de NP de Pt coloidal diferentes (función suelo NPs de Pt 0 nM; función media ~1 nM de NPs de Pt; función tope 2 nM de NPs de Pt) como se muestra en la Figura 7.

La Figura 15 muestra dos partes de transientes de corriente (15A y 15C) y registros (intensidad de ECL versus tiempo) (15B y 15D) en el electrodo ITO en una solución antes (curvas "NEGRA") y después (curvas "ROJAS") de inyección de ~ 2 nM de NPs de Pt. La solución contiene NaClO₄ 0,1 M, tampón fosfato (pH 7,0), Ru(bpy)₃(ClO₄)₂ 1,3 μM y Tpr 5 mM. El potencial ITO fue aumentando escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE para dos duraciones de tiempo diferentes: 4 s (tiempo de residencia del canal), τ_{ch}= 15,6 ms) en las Figuras 15A y 15B, y 250 ms (τ_{ch}= 975 μs) en las Figuras 15C y 15D.

La Figura 16 describe una realización ilustrativa de una célula electroquímica y el reordenamiento del electrodo ITO y sistema óptico que puede emplearse en los métodos presentes descritos en este texto. La célula ejemplar incluye un electrodo de trabajo ITO, un electrodo contador, un electrodo de referencia al igual que un multiplicador de fotones acoplado a la célula muestra a través de un tubo fotomultiplicador.

Descripción detallada

Mientras se discuten en detalle y a continuación la puesta en funcionamiento y uso las diferentes realizaciones del presente método y aparato, se apreciará que la presente aplicación proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden materializarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas discutidas en este texto son meramente ilustrativas de formas específicas de llevar a cabo y usar el presente método y aparato y no tienen la intención de limitar el alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones.

La presente aplicación proporciona un método basado en el factor significativo de amplificación de la intensidad de ECL implicado en una reacción rápida de una especie en eventos únicos de colisión de partícula. La reacción de las especies en solución en la superficie de la nanopartícula NP no produce deseablemente una ECL significativa en la superficie del electrodo de trabajo en la misma región de potencial. En tales situaciones, cuando la célula electroquímica funciona en tal región de potencial, la ECL significativa se generará solamente a partir de eventos generados electroquímicamente que ocurren en la superficie de las nanopartículas, que están en contacto eléctrico con el electrodo de trabajo (y no el mismo electrodo de trabajo).

Los restos ECL empleados en los presentes métodos son compuestos, que son capaces de estar implicados en una reacción redox dando como resultado especies electrogeneradas y la emisión de luz (electroquimioluminiscencia"). Por ejemplo, la electroquimioluminiscencia puede implicar luminiscencia generada por un proceso en el cual uno o más reactantes están estimulados electroquímicamente y experimentan una o más reacciones químicas para producir una especie (derivada de restos ECL) que emite luz, preferentemente repetidamente. En otras palabras, los restos ECL son compuestos que son capaces de ser convertidos vía una reacción redox iniciada electroquímicamente en una especie que emitirá luz, generalmente a una longitud de onda del espectro visible. Los restos ECL pueden incluir un complejo que contiene un metal. Los metales adecuados que pueden incluir tales compuestos incluyen rutenio, osmio, renio, cerio, europio, terbio, y/o yterbio. Los compuestos que contienen rutenio como ligandos orgánicos se emplean comúnmente en los presentes métodos. El compuesto que contiene un metal incluye a menudo ligandos polidentados, p.ej. ligandos polidentados aromáticos como bipyridilo, bipyridilo sustituido, 1,10-fenantrolino y/o 1,10-fenantrolino sustituido. Ejemplos específicos de restos ECL adecuados incluyen

compuestos que incluyen un resto bis(2,2'-bipiridil)rutenio(II) o tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II). Un grupo de tales compuestos que puede actuar como una marca ECL son sales de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, p.ej. $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$.

Las nanopartículas empleadas en los métodos descritos en el texto pueden ser producidas por cualquier variedad de métodos conocidos por el experto en la técnica. Esto incluye métodos para formar NPs al combinar átomos (o radicales y moléculas más complejos) y por dispersión de material a granel, p.ej. evaporación térmica, pulverización iónica, reducción en solución, reducción en microemulsiones y condensación. Por ejemplo, las NPs de platino pueden ser producidas a partir de una solución preparada al combinar una solución acuosa de H_2PtCl_6 con una solución acuosa de citrato de sodio y luego, bajo fuerte agitación, añadir una solución acuosa de NaBH_4 gota a gota. La solución se mantuvo agitando durante otra media hora. El experto en la técnica reconocerá que se pueden preparar similarmente otras soluciones que contengan nanopartículas coloidales, p.ej. soluciones coloidales de nanopartículas de platino, paladio o rutenio.

El tamaño de las NPs producidas por tales métodos puede estar en el intervalo de menos de 1 nm a aproximadamente 100 nm. Más comúnmente, un intervalo para el tamaño medio de tales nanopartículas es aproximadamente 1 nm a 10 nm de diámetro y pueden ser aproximadamente 2 a 7 nm de diámetro. Las partículas adecuadas, p.ej. nanopartículas de platino conductivas, pueden tener un intervalo de tamaño de aproximadamente 2 nm a 6 nm de diámetro con un diámetro medio de aproximadamente 4 nm.

Las soluciones de NPs coloidales empleadas en los presentes métodos pueden tener una concentración de NPs coloidales en el intervalo pM a nM. En algunos casos, se emplean concentraciones de NP de aproximadamente 1 a 10 nM. Tales soluciones pueden prepararse convenientemente al añadir alícuotas, p.ej. alícuotas 10 a 100 μL de una solución madre que contiene aproximadamente 0,1 μM (100 nM) de NPs coloidales, hasta un gran volumen (p.ej. cerca de 5 mL) de una solución muestra. Para algunas aplicaciones, se pueden emplear las soluciones muestra que contienen aproximadamente 100 pM de nanopartículas coloidales o menos.

En los presentes métodos, las soluciones muestra contienen típicamente concentraciones muchos mayores del compuesto marcado ECL y coreactante opcional. Por ejemplo, cuando la concentración de las NPs coloidales está en el intervalo de pM a nM, los presentes métodos pueden llevarse a cabo adecuadamente con soluciones muestra que incluyen aproximadamente 1 a 20 μM de compuesto marcado ECL, p.ej. una sal de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, y aproximadamente 1 a 100 mM de un coreactante ECL, como TPrA.

La Figura 1 es un esquema de un evento único de colisión de nanopartícula. La partícula difunde hacia el electrodo donde colisiona y cataliza algunas reacciones de oxidación (en este esquema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y TPrA) durante el tiempo de residencia. Las colisiones de NPs de platino únicas en un electrodo se observaron electroquímicamente por sus característicos transientes (intensidad de ECL versus tiempo) para reacciones catalizadas por partículas. Un evento único se caracteriza por ECL generada por reacciones electrocatalizadas de una especie indicadora y un coreactante (p.ej. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y TPrA) presentes en la solución. Puesto que las reacciones electrocatalizadas no ocurren en el electrodo seleccionado al potencial de interés y puede implicar una concentración alta de especie indicadora y coreactante con coeficientes de difusión mucho mayores que la NP, ocurre una amplificación significativa en la intensidad de ECL. Cada colisión produce un perfil único (intensidad de ECL versus tiempo) que puede correlacionarse con el tamaño de partícula, el tiempo de residencia de la partícula y la naturaleza de la interacción de la NP con la superficie del electrodo. El método presente permite también el estudio de cinéticas heterogéneas en NPs únicas y la aplicación de una técnica electroanalítica muy sensible.

En un macroelectrodo plano, p.ej. un electrodo de óxido de estaño e indio ("ITO") inmerso en una dispersión de NPs de Pt 2 nM en una solución de NaClO_4 0,1 M que contiene tampón fosfato (pH $\sim$ 7,5), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 10 μM y tri-n-propilamina 50 mM ("TPrA") como coreactante, el flujo controlado por la difusión de partículas a la superficie del electrodo, $J_{p,s}$, cuando las partículas se adhieren a la superficie, viene dado por:

$$J_{p,s} = D_p^{1/2} C_p / \pi^{1/2} t^{1/2}$$

donde D_p es el coeficiente de difusión de la partícula y C_p es la concentración de la partícula. Generalmente, en el sencillo proceso de carga o faradaico en el nanoelectrodo o NP, solamente uno o unos pocos electrones (n_p) serían transferidos entre la NP y el electrodo para dar una corriente, $i_{p,s} = n_p F A_e J_{p,s}$ (donde A_e es el área del electrodo y F es la constante de Faraday), que es demasiado pequeña para ser observada por encima del nivel de corriente de fondo. Sin embargo, en un ultramicroelectrodo ("UME") de radio r_0 , la corriente para una colisión es un transiente que incluye carga de partículas y una corriente faradaica cambiante para la oxidación R que alcanza el estado estacionario al tiempo $-r_0^2/D_R$, donde D_R es el coeficiente de difusión de R. Puesto que pueden ocurrir diferentes tipos de colisión, el transiente corriente-tiempo (" i -t") para un evento de colisión se determinará por el tiempo de residencia, T , de la partícula en el electrodo, es decir, el periodo de tiempo cuando el electrodo puede pasar electrones a la partícula. Si la partícula se pega al electrodo durante un tiempo suficiente para que se alcance una corriente en estado estacionario, y el reactante R de concentración C_R solamente está oxidado en la partícula de radio a , un factor de amplificación dado por los flujos relativos en estado estacionario de las partículas y R, es

$\sim(B/16)(D_R C_{R0})/(D_P C_{P0})$. Esto conducirá a corrientes relativas en estado estacionario de $\sim B(D_P C_{P0})/4(D_P C_{P0})$ (asumiendo $n_P = n_R$, n_R es el número de electrones implicados en la reacción). Para una solución de partículas 1 pM e indicador R 10 mM, el factor de amplificación estimado para una partícula de radio 1 nm puede ser nueve a diez órdenes de magnitud, asumiendo el coeficiente de difusión de la partícula son diferentes por aproximadamente un orden de magnitud. Los métodos y reactivos para amplificar corriente a partir de una reacción catalítica usando NPs metálicas se describen y se proporcionan en este texto

Tal como se muestra en la Figura 2D, las reacciones de la especie indicadora y el coreactante a una concentración relativamente alta en la solución no generan una intensidad de ECL apreciable en un electrodo ITO a potenciales negativos de 0,88 V mientras que una intensidad de ECL significativa puede observarse fácilmente en un electrodo de disco de Pt a un potencial de 0,75 V versus SCE (véase Figura 2B) en las mismas condiciones de solución. Los correspondientes voltamogramas cíclicos se muestran en las Figuras 2A y 2C.

La Figura 3 son transientes de corriente (3A) y curva (intensidad de ECL versus tiempos) (3B) en un electrodo de disco de Pt en una solución de NaClO_4 0,1 M que contiene un tampón fosfato 25 mM (pH = 7.5), $\text{Ru}(\text{bpy})_3(\text{ClO}_4)_2$ saturado y TPrA 50 mM. Ambas corriente y transientes de ECL fueron curvas suaves con niveles de ruidos bajos.

La Figura 4 muestra voltamogramas cíclicos (4A) e intensidad de ECL (kilocuentas por seg, "kcps") versus curvas de potencial (4B) en un electrodo ITO en una solución antes de inyectar NPs de Pt (curvas "NEGRAS"), después de inyectar 1 nM de NPs de Pt (curvas "ROJAS"), y después de inyectar 2 nM de NPs de Pt (curvas "AZULES"). Las soluciones contienen NaClO_4 0,1 M, tampón fosfato (pH = 7.0), $\text{Ru}(\text{bpy})_3(\text{ClO}_4)_2$ 10 μM y TPrA 50 mM. La velocidad de escaneo del potencial = 20 mV/a partir del punto s. Sobre un ITO, en ausencia de NPs de Pt, como se muestra en la curva "NEGRA" de la Figura 4B, no se observa una intensidad de ECL apreciable hasta que su potencial es ligeramente positivo de 0,85 V versus SCE, mientras que una corriente significativa empezó a fluir a potenciales cercanos a -0,6V (véase la curva "NEGRA" de la Figura 4A). Sin embargo, si la NP está presente y puede electrocatalizar otras reacciones, dicha oxidación de una especie R a O (p.ej. oxidación de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ o TPrA) en una NP de Pt en contacto con el ITO, se puede observar una mejora significativa en la intensidad de ECL tal como se muestra en la curva "ROJA" de la Figura 4B pueden observarse a tensiones de polarización menores ($\leq 0,75$ V). Nótese que la mejora en la intensidad de ECL, tal como se muestra en la Figura 4B, aumenta con las concentraciones mayores de NPs de Pt, indicando que la mejora de la ECL está asociada con la reacción electroquímica inducida por NPs de Pt en contacto con el ITO.

En una realización del presente método, la Figura 5 muestra los transientes de corriente en un electrodo ITO en una solución antes y después de inyectar partículas de platino. La Figura 5A es una gráfica de los transientes de corriente en un electrodo ITO en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 3 μM y TPrA 5 mM en ausencia de NPs de platino; la Figura 5C es una gráfica de los transientes de corriente en un electrodo ITO en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 3 μM y TPrA 5 mM en presencia de ~2 nM de NPs de Pt. La Figura 5B (cuentas de fotones totales= 8428) es la curva correspondiente (intensidad de ECL versus tiempo) de la Figura 5A. La Figura 5D (cuentas de fotones totales= 9968) es la curva correspondiente (intensidad de ECL versus tiempo) de la Figura 5C. La Figura 5E es una imagen TEM representativa de NPs de Pt, que tiene un diámetro medio = 4 nm. El potencial ITO fue aumentado escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE para una duración de 4 segundos.

La solución coloidal de platino se obtuvo al reducir H_2PtCl_6 con borohidruro de sodio en presencia de citrato de sodio. Los tamaños de partícula eran entre aproximadamente 2 a 6 nm, con una mayor distribución a 4 nm de diámetro. En algunas realizaciones, se inyectaron aproximadamente 40 μL de soluciones coloidales de Pt (-0,1 μM de NPs de Pt) en 4 mL de solución de electrolito tamponado para dar 1 nM de NPs de Pt en la célula electroquímica. Después de mezclar bien la solución, el transiente de corriente y la respuesta (intensidad de ECL versus tiempo) fueron registrados al aplicar un potencial de paso de amplitud deseada sobre el electrodo auxiliar y al monitorizar simultáneamente la variación de la corriente y la intensidad de ECL con el tiempo.

La Figura 6C muestra el número de ocurrencias del evento de ECL en un electrodo ITO que tiene la misma intensidad, expresada como la función de densidad de probabilidad ("PDF") para un registro (intensidad de ECL versus tiempo) mostrado en la Figura 6A (cuentas de fotones totales= 8428) cuando no están presentes NPs de Pt. Nótese que la PDF muestra una distribución Gaussiana normal con una intensidad de ECL de media que alcanzó un máximo a ~33 cuentas. La Figura 6D muestra el número de ocurrencias del evento de ECL en un electrodo ITO que tiene la misma intensidad, expresada como la función de densidad de probabilidad ("PDF") para un registro (intensidad de ECL versus tiempo) mostrado en la Figura 6B (cuentas de fotones totales= 9968) cuando están presentes 2 nM de NPs de Pt. El potencial ITO fue aumentado escalonadamente de 0 a 0,91 V versus SCE para una duración de 4 segundos.

La Figura 7 muestra las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) (cuentas de fotones totales= 8428), 7B (cuentas de fotones totales= 9217), y 7C (cuentas de fotones totales= 9968) y las correspondientes PDFs (7D, 7E, y 7F respectivamente) y sus distribuciones Gaussianas descompuestas en el electrodo ITO a tres concentraciones de NP de Pt diferentes (0 nM de NPs de Pt (7A y 7D); ~1 nM de NPs de Pt (7B y 7E); -2 nM de NPs de Pt (7C y 7F)) pero a casi las mismas concentraciones de la especie indicadora y coreactante. Tal como se muestra, la intensidad de ECL total incrementó a razón de ~10 % por cada incremento de ~1 nM de NPs de Pt añadidas. Además del pico PDF mayor a ~33 cuentas observadas en ausencia de NPs de Pt, se desarrollan múltiples a medida que la

concentración de NPs de Pt aumenta, p.ej. picos cercanos a 20 y 46 cuentas para la curva mostrada en la Figura 7E. La contribución relativa de la intensidad de ECL total del pico cerca de 46 cuentas incrementa al incrementar la concentración de NP, sugiriendo que este pico es contribución principalmente de las colisiones de NP. Nótese que la posición del pico de cercana a 34 cuentas depende solo ligeramente de la concentración de NP.

La Figura 8 muestra diferentes registros (intensidad de ECL versus tiempo) resultantes de las diferentes concentraciones de la especie indicadora al mantener casi constantes las concentraciones de NPs de Pt y coreactante. Tal como se muestra, la intensidad de ECL total aumenta con el incremento de la concentración de la especie indicadora, p.ej., $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en este caso. La fluctuación en la intensidad de ECL sobre la ECL de fondo continua también aumenta con el incremento de la concentración de la especie indicadora. Este comportamiento se refleja bien en los correspondientes PDFs mostrados en la Figura 9, que muestra no solamente la distribución sino también que la amplitud relativa de los PDFs son fuertemente dependientes de la concentración de la especie indicadora.

Cada perfil de corriente y ECL está asociado con colisiones de molécula y NP únicas individuales sobre el electrodo de medición. Las características de un perfil individual (intensidad de ECL versus tiempo) se ven afectadas por el tamaño de partícula, el tiempo de residencia de la partícula, la interacción entre partícula y la superficie del electrodo, los tiempos de vida de los intermedios activos de la especie indicadora y coreactante y las cinéticas para la generación del estado excitado de la especie indicadora. En la mayoría de los casos, una partícula abandona el electrodo después de su colisión por lo que la intensidad de ECL aumenta muy bruscamente al mostrar un pico de fotón grande pero luego vuelve a la ECL de fondo continua.

La Figura 10 ilustra los transientes de corriente y las curvas correspondientes (intensidad de ECL versus tiempo) en un electrodo ITO a diferentes potenciales aplicados. En la región controlada cinéticamente (potencial bien negativo del pico de potencial en los voltamogramas cíclicos o curvas (intensidad de ECL versus tiempo) mostradas en la Figura 4), ambas intensidad de ECL y la fluctuación de la intensidad de ECL aumentan al aumentar la tensión de polarización (véase p.ej. Figuras 10D y E). También existe una interacción atractiva entre la partícula cargada negativamente y la superficie cargada positivamente (el efecto electroforético), causando que las partículas se peguen a la superficie del electrodo. Hemos examinado este efecto ajustando el potencial a valores incluso más positivos. Observamos más colisiones (véase Figura 10F), aunque están implicadas la transferencia de masa y limitaciones cinéticas.

Las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) y las correspondientes PDFs a diferentes potenciales de paso se muestran en la Figura 11. Las fluctuaciones en la intensidad de ECL son características de distribuciones multinormales tal como se muestra en las Figuras 11D, E y F. La razón de que la ECL generada en cada evento de colisión individual fluctúe es debido a la naturaleza aleatoria del transporte de NP y colisión en la superficie del electrodo (p.ej. cómo de cerca puede acercarse una partícula a la superficie del electrodo dentro de una distancia en la cual el efecto túnel del electrón sea posible), el tiempo de residencia, y también los efectos del tamaño de partícula.

Por comparación, los transientes de ECL y las correspondientes PDFs resultantes de diferentes concentraciones de la especie indicadora en ausencia de NPs de Pt son evaluadas (véase la Figura 12). Tal como se muestra, las PDFs muestran predominantemente distribuciones normales únicas con la intensidad de ECL media casi proporcional a la concentración de la especie indicadora.

La Figura 13 compara funciones de densidad espectral ("SDFs" por sus siglas en inglés) de los transientes de ECL en una solución que contiene o sin contener NPs de Pt coloidales. Las SDFs de transientes de ECL expresan la fluctuación de la intensidad de ECL en el campo de la frecuencia. Tal como se muestra, en una solución con o sin NPs de Pt, una gran parte de la intensidad de ECL total procede del ruido de fondo continuo del estado casi estacionario ($f = 0$ Hz). La presencia de NPs de Pt en la solución contribuye significativamente a aquellas fluctuaciones de intensidad de ECL de varios componentes de baja frecuencia ($f \geq 3$ Hz), sugiriendo la polidispersidad de las NPs examinadas.

Las funciones de correlación de tiempo (TCFs por sus siglas en inglés) de varios registros (intensidad de ECL versus tiempo) como una función de las concentraciones de NP de Pt (véase Figura 14) muestra que la intensidad de ECL decae en ms para alcanzar valores de estado casi estacionario. La respuesta temporal de la ECL implicada en una reacción rápida EC de una especie (y/o su coreactante) en eventos únicos de colisión de nanopartícula podría alcanzar el límite de difusión (unos pocos ns) y permitimos estudiar cinéticas rápidas.

La Figura 15 muestra la corriente y transientes de intensidad de ECL en un electrodo ITO en una solución antes y después de inyectar NPs de Pt. Tal como se muestra en las Figuras 15A y 15C, a medida que se usa un electrodo ITO como electrodo de medición, los transientes de corriente son curvas que decaen suavemente, estén o no presentes NPs de Pt. Sin embargo, las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) muestran fluctuaciones significativas en la amplitud y frecuencia de cuentas de fotones (véanse Figuras 15B y 15D). Cuando las concentraciones de la especie indicadora y coreactante se mantienen casi constantes, las fluctuaciones en las cuentas de fotones dependen fuertemente de la concentración de NPs de Pt en la solución sugiriendo que están asociadas con las reacciones catalizadas de NPs mientras colisionan con el electrodo auxiliar.

Los eventos únicos de colisión de nanopartícula se examinaron usando $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ como indicador y TPrA como el coreactante, el experto en la técnica sabrá que otros indicadores y/o coreactantes pueden usarse. Con el fin de reducir la corriente de fondo y mejorar la eficacia de ECL relativa, un electrodo o NPs pueden sufrir ciertos tratamientos superficiales. Por ejemplo, un electrodo de oro puede ser revestido con una monocapa ensamblada sobre la superficie de bencenodimetanotiol, que forma una monocapa estable capaz del efecto túnel de especies en solución. El otro grupo tiol puede unirse fuertemente a las partículas de platino. El macroelectrodo o UME puede incluir ITO, oro, níquel, Pt, Ir, Rh, y/o carbono (p.ej., carbón vítreo, grafito o diamante). Además, la especie indicadora puede ser $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ u otros materiales conocidos por el experto en la técnica.

La Figura 16 representa un esquema de una célula electroquímica ejemplar 2 que puede emplearse en el método presente. La célula incluye un electrodo de trabajo ITO 4 y un sistema óptico, que incluye un detector de fotones 14. En la célula representada en la Figura 16, no se sitúan lentes de enfoque entre el electrodo ITO y el orificio de entrada del detector de fotones, pudiendo ser un fotodiodo de tipo avalancha. La célula descrita en esta figura también incluye un electrodo contador 6, que puede ser un electrodo contador de platino, un electrodo de referencia 8, tal como un electrodo de referencia Ag/AgCl, y una tapa 10. En una realización, la célula incluye un sistema óptico, que incluye una fibra óptica 10; p.ej., una fibra óptica que tiene un diámetro de aproximadamente 1 a 2 mm, conectada al detector de fotones 14 con la célula electroquímica 2. El fotodiodo de tipo avalancha puede tener un área activa de aproximadamente 10 e-5 a 10 e-4 cm^2 . El área activa del electrodo de trabajo ITO puede ser adecuadamente aproximadamente $0,01$ a $0,5 \text{ cm}^2$.

La presente aplicación proporciona un método nuevo para observar eventos únicos de colisión de nanopartícula con un macro electrodo o un UME. Un evento único caracterizado por la corriente o ECL generada a través de la reacción catalizada por la partícula de un indicador con o sin un coreactante presente en solución. Puesto que el indicador puede elegirse para tener una concentración alta y coeficiente de difusión alto, ocurre la amplificación significativa. Cada colisión produce un transiente de corriente o ECL único que puede correlacionarse con el tamaño de partícula, el tiempo de residencia de la partícula, y la interacción de la partícula con la superficie del electrodo. Al modificar la concentración de las partículas, tamaño de partícula (p.ej. NPs de citrato de platino versus NPs de oxalato de platino), potencial de sustrato aplicado, y la concentración del indicador, sería posible usar los perfiles i-t o las curvas (intensidad de ECL versus tiempo) para obtener información sobre la reacción del indicador en una partícula única. En comparación con la amplificación señales ópticas de conductividad y de masa usando NPs, la amplificación de ECL o corriente catalítica en el presente método permite la observación de los eventos únicos de colisión de nanopartícula y a través de i-t o las curvas (intensidad de ECL versus tiempo), el estudio de cinéticas electroquímicas en el nivel de partícula única. Además, puede ser útil para determinar distribuciones de tamaño de partícula y como un método electroanalítico muy sensible, quizás a nivel de evento único de unión.

La solución de NP de platino se preparó al combinar 60 mL de una solución acuosa de H_2PtCl_6 2 mM con 3 mL de una solución acuosa de citrato de sodio 50 mM, luego agitación fuerte, se añadieron gota a gota 7 mL de una solución acuosa de NaBH_4 120 mM. La solución resultante se mantuvo bajo agitación durante otra media hora. El experto en la técnica reconocerá que otras soluciones de NP pueden prepararse similarmente, p.ej., platino, paladio y rutenio.

La presente aplicación describe métodos, composiciones y kits para analizar un analito químico que tiene una célula electroquímica conectada a un aparato de medición. La célula electroquímica contiene una solución que tiene una o más NPs activas más conductivas o redox, generalmente en forma de una solución coloidal de las NPs, uno o más analitos químicos (como indicador y un coreactante). Además, la célula electroquímica contiene uno o más electrodos en comunicación con la solución. Se generan una o más propiedades electrocatalíticas por la interacción de una o más NPs activas conductivas o redox y la muestra líquida y pueden medirse usando uno o más electrodos u otros dispositivos de detección, p.ej., un detector de fotones para medir radiación electromagnética emitida.

La presente aplicación proporciona un método que incluye el uso de una o más NPs activas conductivas o redox en solución con la célula electroquímica. Las NPs conductivas pueden ser enteramente o parcialmente de metal. Por ejemplo, las una o más NPs conductivas pueden ser NPs de platino, NPs de oro, NPs de paladio, NPs de carbono, NPs ITO o mezclas y sus combinaciones. Las NPs pueden también tener núcleos de una material diferente que el material externo de la NP. Aunque, la NPs puede ser de un diámetro de tamaño entre aproximadamente $0,5 \text{ nm}$ y aproximadamente 100 nm , un intervalo de tamaño común para una realización está entre aproximadamente 1 nm y 10 nm de diámetro y una media de 4 nm de diámetro. Además, la distribución de tamaño de diámetro de NP puede ser generalmente uniforme, disperso, o variar. Las NPs pueden tener grupos diferentes de partículas que tienen generalmente el mismo diámetro dentro del grupo pero diferir el diámetro relativo de otros grupos en la solución.

La una o más propiedades electrocatalíticas pueden ser cualquier propiedad que puede medirse por el aparato; sin embargo la propiedad más común es una amplificación de ECL electrocatalítica de una reacción redox catalizada por conducción de NPs. Ejemplos de otras propiedades adecuadas incluyen una corriente; una resistencia, una impedancia, una capacitancia, una inductancia o una de sus combinaciones.

Realizaciones ilustrativas

En una realización, se proporciona un método para analizar una muestra. El método incluye añadir una o más NPs activas conductivas o redox a una muestra líquida en una cámara de muestra; y observar una o más propiedades electroquímicas y/u ópticas generadas por la interacción de las NPs y la muestra líquida en un electrodo. Medir una o más propiedades electroquímicas y/u ópticas puede incluir medir la intensidad electroquimioluminiscente resultante de una reacción redox catalizada por nanopartículas. En algunas realizaciones, la medida puede incluir medir la amplificación de la corriente de una reacción redox catalizada por las nanopartículas. Otras propiedades electrocatalíticas, que pueden medirse como parte de tales métodos, incluye corriente, una resistencia, una impedancia, una capacitancia, una inductancia o una de sus combinaciones. En algunos casos donde las propiedades ópticas que se miden incluyen medir la intensidad electroquimioluminiscencia, la muestra comprende además un coreactante ECL, p.ej. una amina terciaria como una trietilamina.

Ejemplos de nanopartículas conductivas adecuadas que pueden emplearse en los presentes métodos incluyen NPs de platino, NPs de oro, NPs de plata, NPs de cobre, NPs de paladio, NPs de carbono, NPs ITO, NPs de óxido conductivas, NPs de polímero conductivas o una de sus combinaciones. Las nanopartículas empleadas en los presentes métodos a menudo tienen una dimensión mayor de no más de aproximadamente 50 nm (p.ej. una dimensión mayor de aproximadamente 1 nm a 25 nm). Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser de aproximadamente 1 nm a 10 nm de diámetro (p.ej., nanopartículas de media aproximadamente 4-5 nm de diámetro).

Ejemplos de materiales de electrodo adecuados para uso en los presentes métodos incluyen ITO, Pt, Au, Ni, Rh, Ir y carbono (p.ej., carbón vítreo, grafito, o diamante). Tal como se ejemplifica en la presente aplicación, las NPs de platino pueden emplearse en métodos que hacen uso de una célula muestra, p.ej. una célula que contiene un electrodo de trabajo de óxido de estaño e indio ("ITO") o de oro.

Las propiedades de ECL adecuadas empleadas en los presentes métodos pueden comprender un compuesto activo redox, luminiscente iónico. Por ejemplo, el compuesto activo redox, luminiscente iónico puede incluir un complejo metálico polidentado electroquimioluminiscente, p.ej., un complejo metálico polidentado que incluye uno o más ligandos polidentados heteroaromáticos y un metal elegido entre rutenio, osmio, renio, cerio, europio, terbio e iterbio. El complejo metálico polidentado puede comprender rutenio y al menos un ligando polidentado elegido entre bipyridilo, bipyridilo sustituido, 1,10-fenantrolina y/o 1,10-fenantrolina sustituida.

Otra realización está dirigida a un kit para analizar un analito químico. El kit incluye:

una o más NPs activas conductivas o redox;

uno o más indicadores químicos, como un marcador ECL; y

uno o más electrodos localizados en una cámara de muestra, como una célula de flujo.

La célula electroquímica se puede conectar a un aparato de medición. Las NPs activas conductivas o redox, el analito químico y al menos un electrodo están en comunicación con una solución de manera a generar una corriente electrocatalítica y/o propiedades de ECL que son legibles con el aparato de medición.

Otra realización proporciona un método para analizar una muestra que incluye (a) añadir una o más nanopartículas a una muestra líquida en una cámara y (b) medir una o más propiedades electroquímicas y/u ópticas resultantes de la interacción de la o más nanopartículas y la muestra en un electrodo. La cámara de muestra tiene uno o más electrodos localizados aquí, p.ej., puede incluir un electrodo de trabajo, un electrodo contador y un electrodo de referencia. La muestra incluye una pluralidad de restos capaces de quimioluminiscencia electrogenerada ("restos ECL") y a menudo también incluirán un coreactante que puede mejorar la quimioluminiscencia electrogenerada de los restos ECL. Por ejemplo, cuando la muestra incluye una pluralidad de rutenio basada en restos ECL, puede ser ventajoso incluir una amina alquilterciaria, como tripropilamina ("TPrA"), como un coreactante en la muestra. Las nanopartículas se forman a partir de una material activo conductivo o redox. Ejemplos de nanopartículas conductivas adecuadas que pueden emplearse en esta realización incluyen NPs de platino, NPs de oro, NPs de plata, NPs de cobre, NPs de paladio, NPs de carbono, y/o NPs de óxido conductivas.

Otra realización proporciona un método para analizar una muestra que incluye (a) añadir una o más nanopartículas conductivas a una muestra líquida en una cámara y (b) medir una o más propiedades electroquímica y/u óptica resultante de la interacción de la o más nanopartículas y la muestra en un electrodo. Ejemplos de nanopartículas conductivas adecuadas incluyen NPs de platino, NPs de oro, NPs de plata, NPs de cobre, NPs de paladio, NPs ITO, NPs de óxido conductivas, NPs conductivas o una de sus combinaciones. Tal como se ha ejemplificado en la presente aplicación, las NPs de platino pueden emplearse en tales métodos que hacen uso de una célula muestra que contiene un electrodo de trabajo de óxido de estaño e indio. En esta realización, medir las propiedades electroquímicas y/u ópticas puede comprender medir la intensidad electroquimioluminiscente resultante de una reacción redox catalizada por las nanopartículas. En algunas realizaciones, la medida puede incluir medir la amplificación de la corriente de una reacción redox catalizada por las nanopartículas.

Otras realizaciones proporcionan un dispositivo para analizar un analito químico que tiene al menos una nanopartícula. El dispositivo incluye adecuadamente una célula electroquímica conectada a un aparato de medición. La célula electroquímica es capaz de contener una solución que comprende uno o más NPs activas conductivas o redox, uno o más analitos químicos, un indicador y tiene uno o más electrodos en comunicación con la solución. El dispositivo es capaz de medir una o más propiedades electroquímicas generadas por la interacción de las NPs y la muestra líquida en uno o más electrodos.

Otra realización está dirigida a un método de amplificación de señal que incluye (a) combinar una o más NPs activas conductivas o redox y una muestra en una cámara que tiene uno o más electrodos; y (b) medir una o más propiedades electroquímicas generadas por la interacción de las NPs y la muestra en uno de los electrodos.

Otra realización proporciona un método de amplificación de señal que comprende las etapas de:

combinar una o más NPs activas conductivas o redox y una muestra en una cámara que tiene uno o más electrodos; y medir una o más propiedades electroquímica y/u óptica generadas por la interacción de una o más NPs activas conductivas o redox y la muestra en uno o más electrodos. Las una o más propiedades electroquímica y/u óptica pueden comprender quimioluminiscencia electrogenerada a partir de una reacción redox catalizada por una o más NPs. La una o más propiedades electroquímica y/u óptica pueden comprender la amplificación de la corriente de una reacción redox catalizada por una o más NPs, p.ej. una reacción redox que implica un resto ECL y, opcionalmente, un coreactante ECL como una tripropilamina (p.ej., tripropilamina).

La presente aplicación proporciona un método y aparato, que puede usarse para observar la ECL generada durante las colisiones de NPs únicas en un electrodo. El método y aparato pueden proporcionar información de procesos electroquímicos en NPs únicas, al igual que la base de métodos electroanalíticos altamente sensibles. Tales métodos incluyen típicamente poner en contacto un muestra líquida, que es una solución coloidal de nanopartículas activas conductivas o redox, con uno más electrodos en una cámara de muestra; y observar al menos una propiedad electroquímica y/u óptica generada por la interacción de las NPs y la muestra líquida en un electrodo. La muestra líquida incluye típicamente un compuesto capaz de ECL (un "compuesto marcado ECL") y opcionalmente, un coreactante ECL, como una amina alquilterciaria, p.ej. tripropilamina. Las soluciones muestra contienen comúnmente concentraciones mucho mayores del compuesto marcado ECL coreactante opcional. Por ejemplo, cuando la concentración de las NPs coloidales está dentro del intervalo pM a nM, la solución muestra puede incluir aproximadamente 1 a 20 μM de un compuesto marcado ECL, p.ej., una sal de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, y aproximadamente 1 a 100 mM de coreactante ECL, como tripropilamina. En algunas realizaciones, la medición puede incluir medir la amplificación de la corriente de una reacción redox catalizada por las nanopartículas. En ciertas realizaciones, la medida puede incluir medir la intensidad electroquimioluminiscente resultante de una reacción redox catalizada por las nanopartículas. Otras propiedades electrocatalíticas que se pueden medir como parte de tales métodos incluyen corriente, resistencia, impedancia, capacitancia, inductancia o una de sus combinaciones.

Otra realización está dirigida a una célula electroquímica de nanoescala para analizar una muestra que contiene al menos una NP donde la célula de nanoescala comprende:

uno o más electrodos posicionados para comunicar con una muestra alojada en una cámara de muestra;

una o más NPs activas conductivas o redox depositadas en la cámara de muestra, donde una o más NPs activas conductivas o redox interactúan con la muestra para generar una o más propiedades de ECL o de corriente electrocatalítica; y detectores en comunicación con uno o más electrodos para detectar una o más propiedades de ECL o corriente electrocatalítica. La célula electroquímica de nanoescala puede comprender un UME o macroelectrodo (es decir, estar posicionado de manera que un compartimiento muestra esté en contacto con el macroelectrodo). Las NPs pueden comprender NPs de platino, NPs de oro, NPs de plata, NPs de cobre, NPs de paladio, NPs de carbono, NPs ITO, NPs de óxido conductivas, NPs de polímero conductivas o redox o una de sus combinaciones.

En otra realización, el método para analizar una muestra comprende: introducir una o más nanopartículas activas conductivas o redox y una muestra líquida en una cámara que tiene uno o más electrodos, donde la muestra comprende una pluralidad de restos de quimioluminiscencia electrogenerada ("ECL"); y medir una o más propiedades electroquímica y/u óptica resultantes de la interacción electrocatalítica de una o más nanopartículas y la muestra en uno o más electrodos. La muestra puede comprender además un coreactante ECL, como una amina alquilterciaria, p.ej. tripropilamina o trietilamina. Los restos ECL pueden comprender un compuesto orgánico que contiene rutenio. Una o más nanopartículas activas conductivas o redox pueden comprender nanopartículas de platino, p.ej., donde los electrodos incluyen un electrodo de trabajo de óxido de estaño e indio. Medir una o más propiedades electroquímicas y/u ópticas puede comprender medir la amplificación de la corriente de una reacción redox catalizada por una o más nanopartículas activas conductivas o redox y/o puede comprender medir la intensidad de electroquimioluminiscencia resultante de una reacción redox catalizada por una o más nanopartículas activas conductivas o redox.

Se contempla que cualquier realización discutida en esta especificación puede implementarse con respecto a cualquier método, kit, reactivo, o composición tal como se ha descrito en este texto, y viceversa. Además, las presentes composiciones pueden usarse para conseguir métodos descritos en este texto.

- 5 Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en este texto se muestran como ilustración y no como limitaciones a la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en varias realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando simplemente experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en este texto. Tales equivalentes se consideran que están dentro del alcance de esta invención y están cubiertos por las reivindicaciones.
- 10 El uso de la palabra “un” cuando está junto al término “comprender” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero solamente es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solamente o que las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la descripción soporte una definición que se refiere a solamente alternativas y “y/o”. A través de esta aplicación, el
- 15 término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe dentro del tema de estudio.
- 20 Tal como se usa en esta especificación y reivindicación(es), las palabras “comprendiendo” (y cualquier forma de comprendiendo, como “comprenden” o “comprende”), “teniendo” (y cualquier forma de tener, como “tienen” o “tiene”), “incluyendo” (y cualquier forma de incluir, como “incluye” o “incluyen”), o “conteniendo” (y cualquier forma de contener, como “contiene” o “contienen”) son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos adicionales no citados o etapas del método.
- 25 La expresión “o sus combinaciones” tal como se usa en este texto se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los ítems listados que preceden la expresión. Por ejemplo, “A, B, C, o sus combinaciones” se entiende que incluye al menos una de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, BCA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, expresamente incluidas son las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más ítems o término, como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, BCCAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica entenderá típicamente que no hay límite en el número de ítems o términos de cualquier combinación, a menos que sea aparente en el contexto.
- 30 Todas las combinaciones y/o métodos descritos y reivindicados en este texto pueden llevarse a cabo y ejecutarse sin experimentación indebida teniendo en cuenta la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una muestra que comprende:
 poner en contacto una muestra líquida con un electrodo de trabajo; donde la muestra líquida comprende una pluralidad de restos quimioluminiscentes electrogenerados (ECL) y una o más nanopartículas activas conductivas o redox;
 detectar una o más propiedades ópticas resultantes de la interacción de una o más nanopartículas y la muestra en el electrodo de trabajo;
 donde detectar una o más propiedades ópticas comprende medir la intensidad de ECL versus transientes de tiempo.
2. El método de la reivindicación 1, donde una o más propiedades ópticas comprende la intensidad de ECL versus transientes de tiempo resultantes de reacciones redox de los restos ECL, con o sin coreactantes, catalizada por una o más nanopartículas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el electrodo de trabajo comprende ITO, Pt, Ir, Rh, Au, carbono, Ni o una de sus combinaciones.
4. El método de la reivindicación 1, donde una o más nanopartículas activas conductivas o redox comprende nanopartículas de platino, nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre, nanopartículas de paladio, nanopartículas de carbono, o una de sus combinaciones.
5. El método de la reivindicación 1, donde una o más nanopartículas tienen una dimensión mayor de no más de aproximadamente 50 nm.
6. El método de la reivindicación 1, donde una o más nanopartículas activas conductivas o redox comprenden nanopartículas de platino; y el electrodo de trabajo es un electrodo de óxido de estaño e indio (ITO) o de oro.
7. El método de la reivindicación 1, donde los restos ECL comprenden un complejo metálico polidentado electroquimioluminiscente.
8. El método de la reivindicación 7, donde el complejo metálico polidentado comprende ligandos polidentados heteroatómicos y un metal elegido entre rutenio, osmio, renio, cerio, europio, terbio e iterbio.
9. El método de la reivindicación 7, donde el complejo metálico polidentado comprende rutenio y al menos un ligando polidentado elegido entre bipyridilo, bipyridilo sustituido, 1,10-fenantrolina y/o 1,10-fenantrolina sustituida.
10. El método de la reivindicación 1, donde la muestra además comprende un coreactante ECL.
11. El método de la reivindicación 1, donde el electrodo de trabajo es un electrodo de óxido de estaño e indio; las nanopartículas son nanopartículas de platino; la muestra líquida comprende amina alifática terciaria; y los restos ECL comprenden un compuesto orgánico que contiene rutenio.
12. El método de la reivindicación 1, donde la superficie del electrodo de trabajo está a un potencial que no produce quimioluminiscencia electrogenerada significativa en ausencia de una o más nanopartículas.
13. El método de la reivindicación 1, donde los restos ECL comprenden un complejo que contiene rutenio incluyendo al menos un ligando polidentado heteroaromático elegido entre bipyridilo, bipyridilo sustituido, 1,10-fenantrolina y/o 1,10-fenantrolina sustituida.
14. El método de la reivindicación 1, donde los restos quimioluminiscentes electrogenerados pueden estimularse electroquímicamente repetidamente para producir especies derivadas de restos ECL que generan luminiscencia.
15. El método de la reivindicación 14, donde los restos ECL comprenden compuestos que contienen rutenio que incluyen ligandos polidentados.

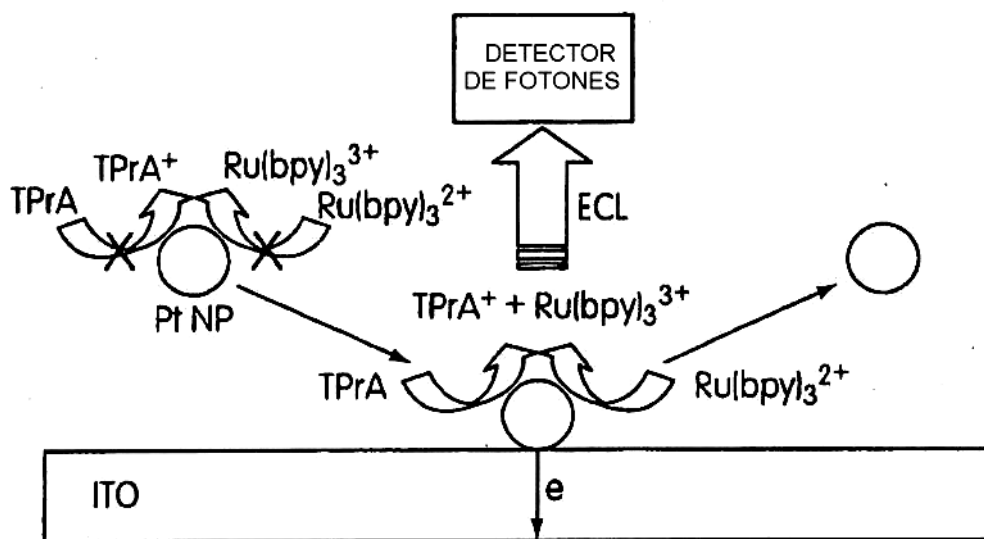


FIG. 1

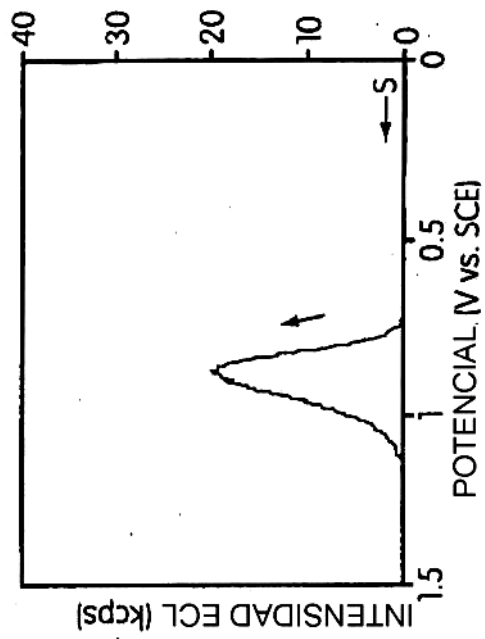


FIG. 2B

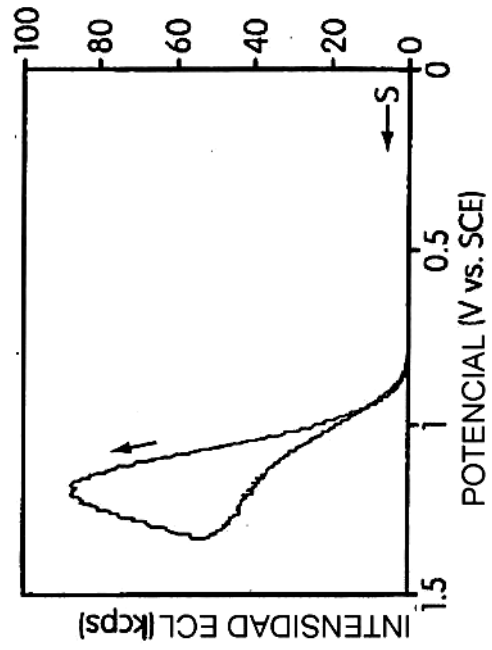


FIG. 2D

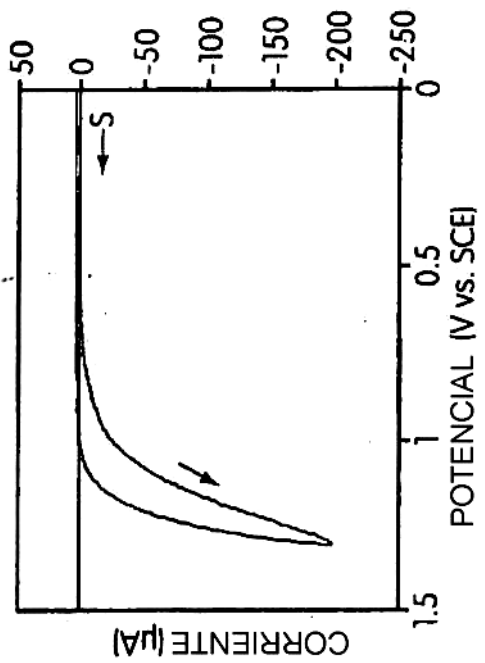


FIG. 2A

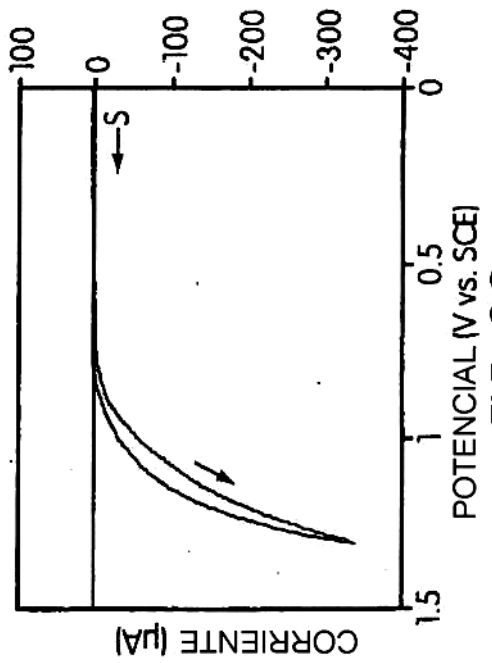


FIG. 2C

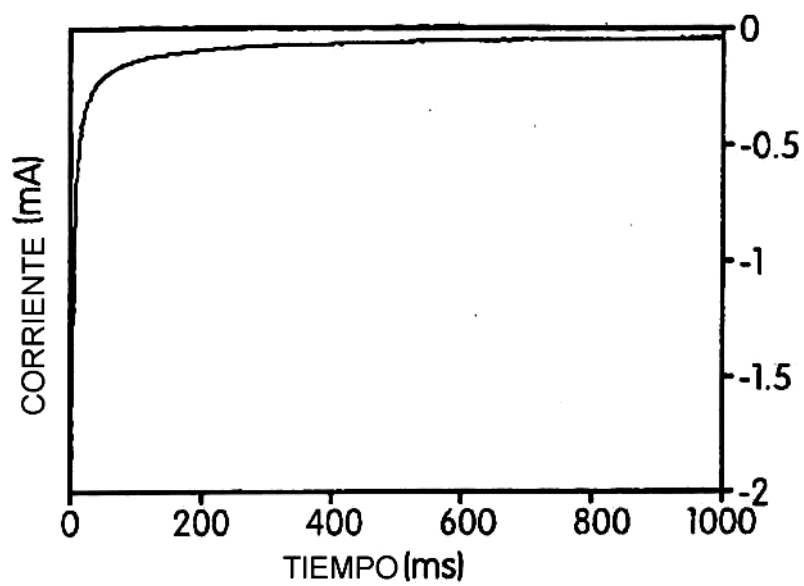


FIG. 3A

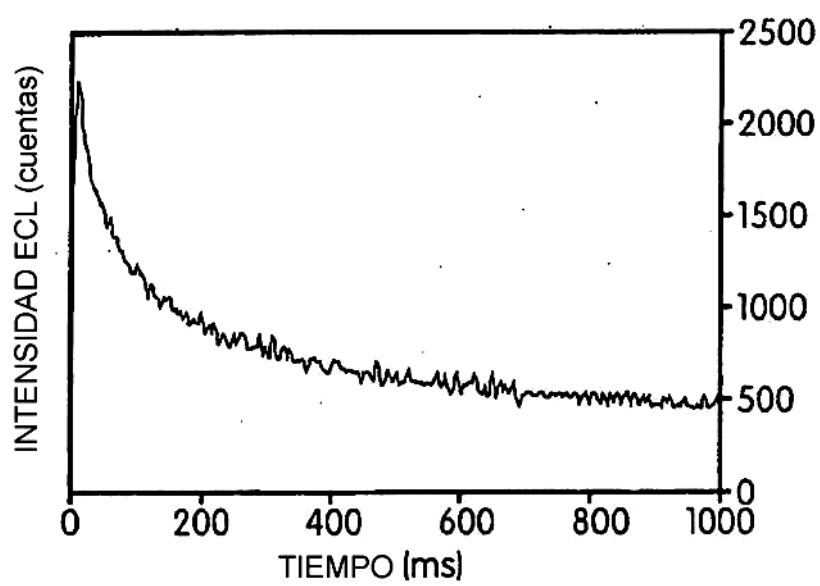


FIG. 3B

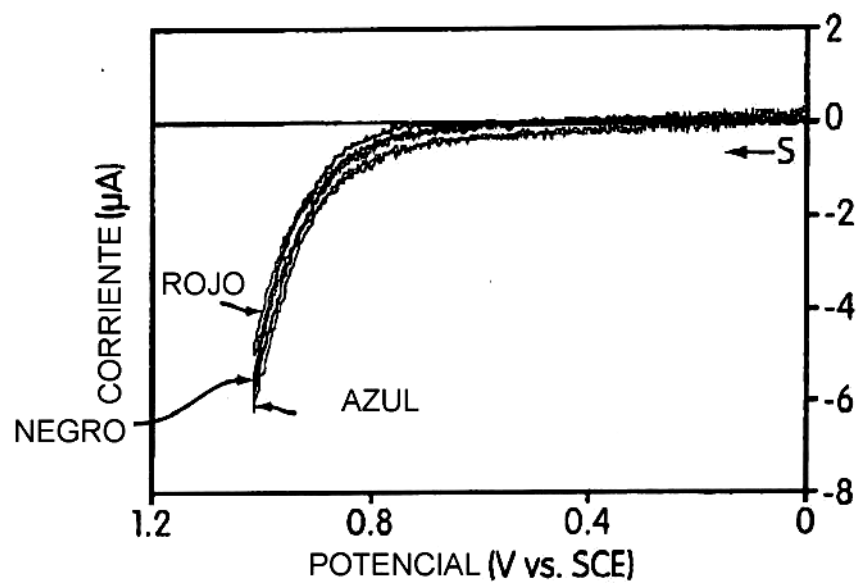


FIG. 4A

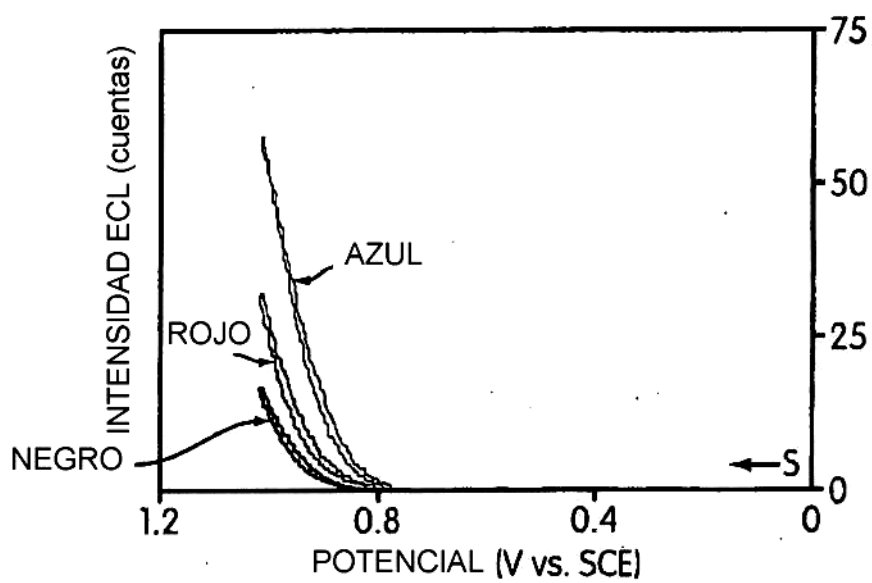


FIG. 4B

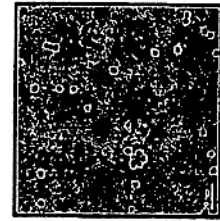
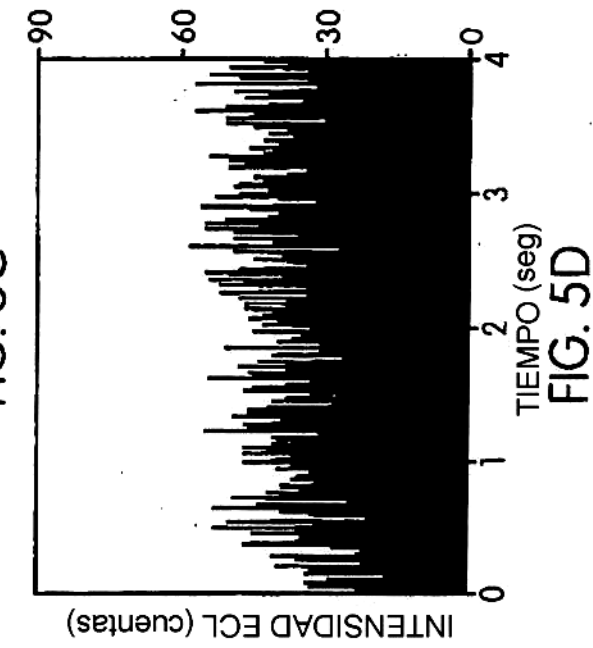
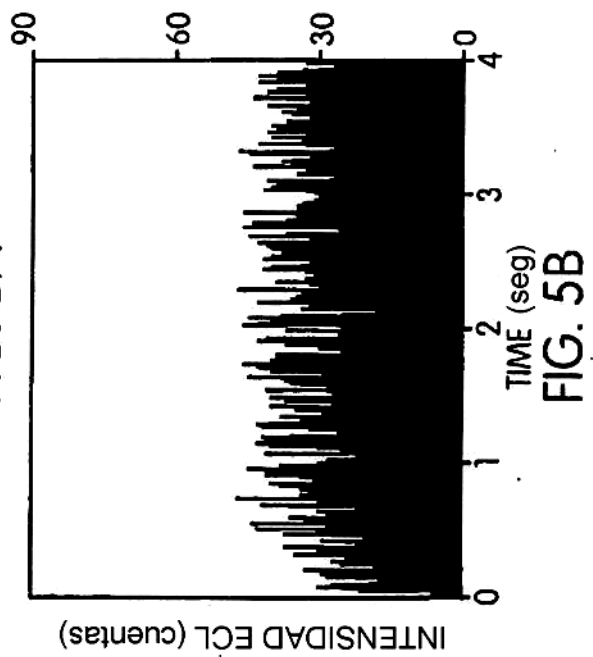
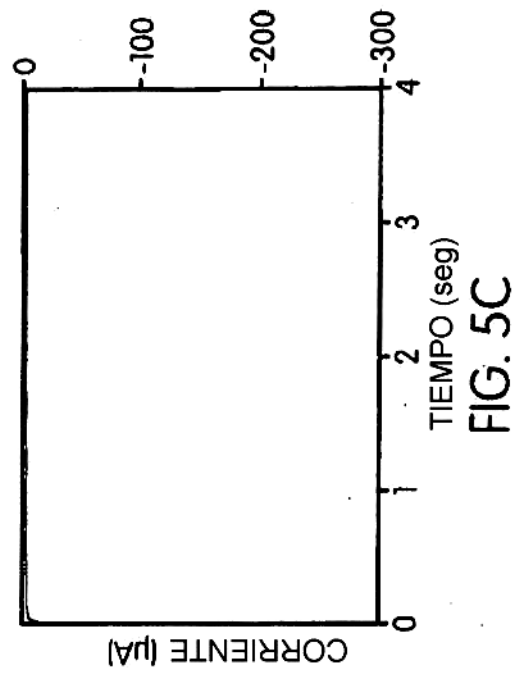
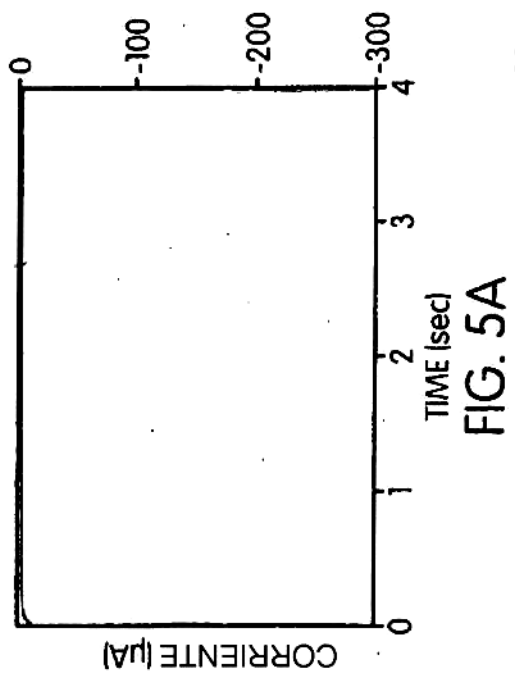
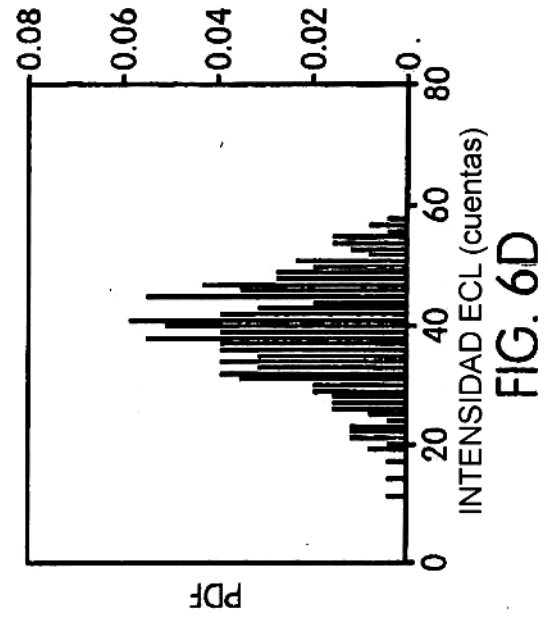
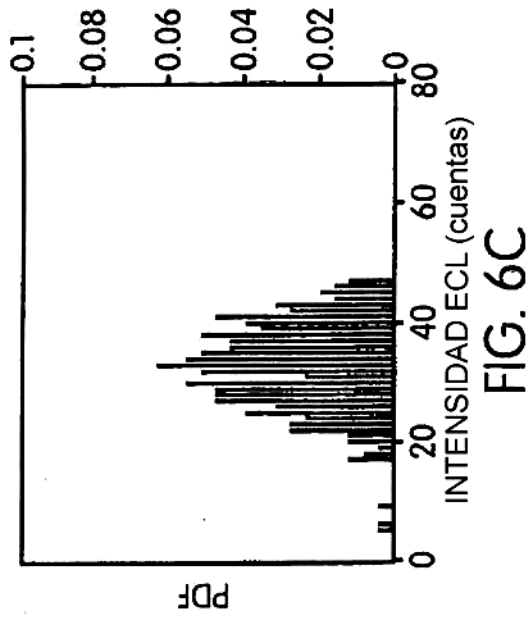
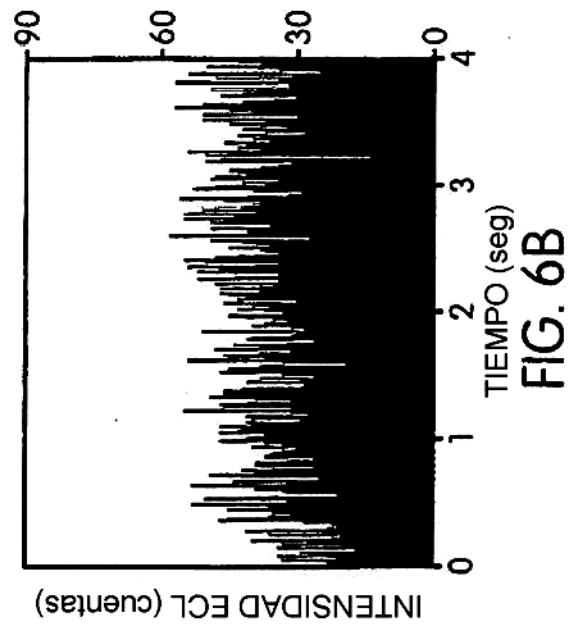
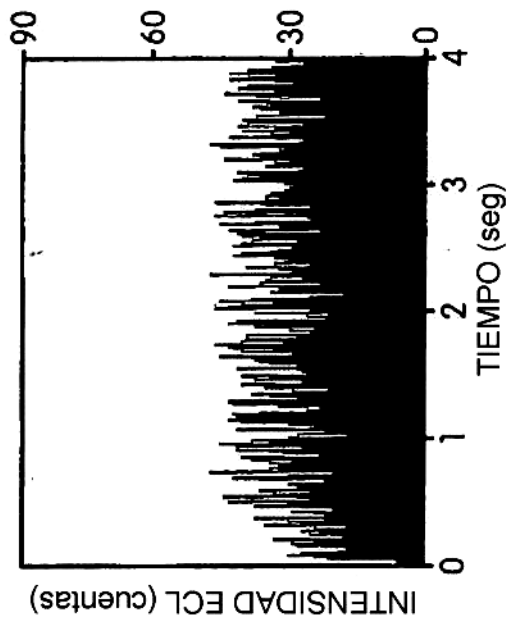


FIG. 5E



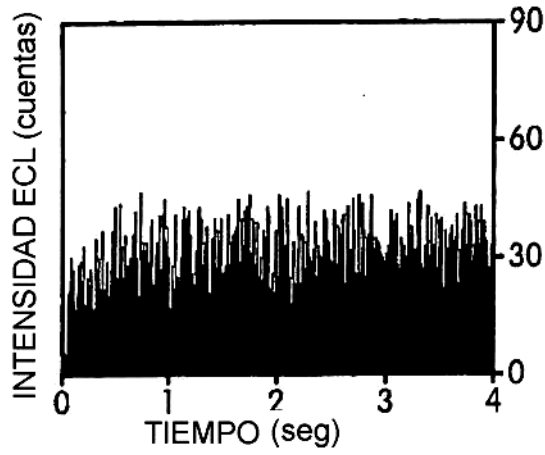


FIG. 7A

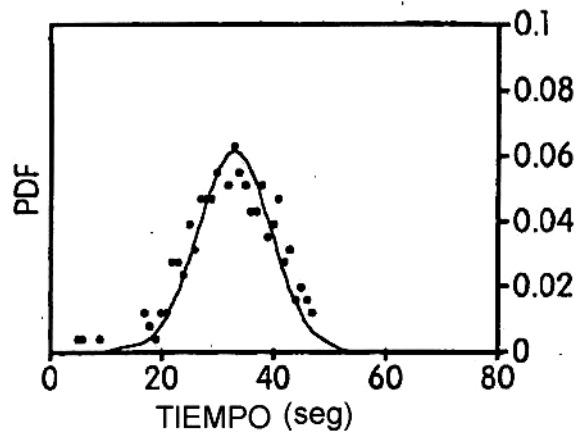


FIG. 7D

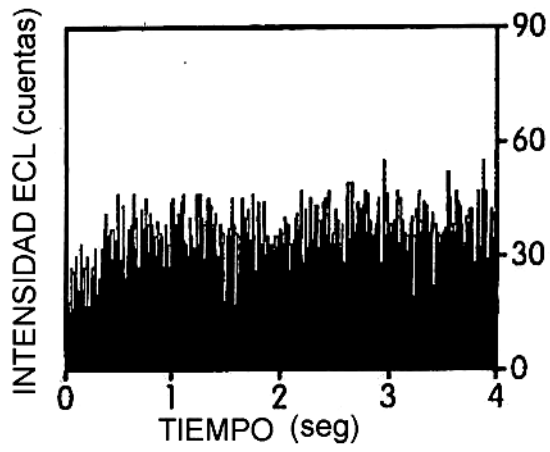


FIG. 7B

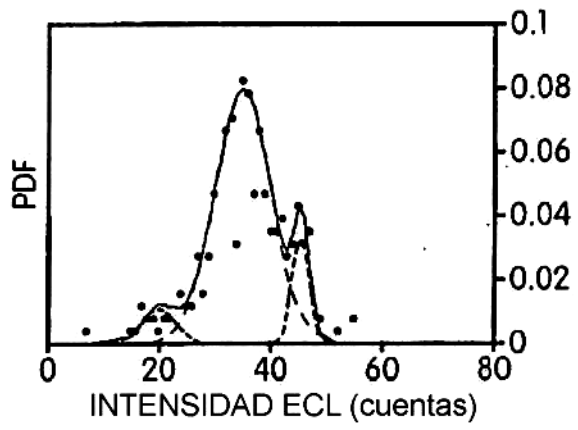


FIG. 7E

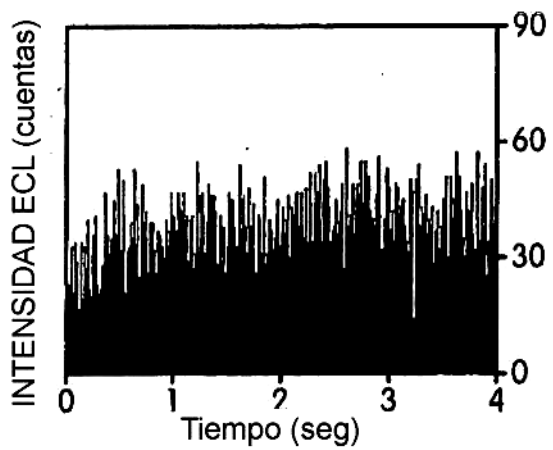


FIG. 7C

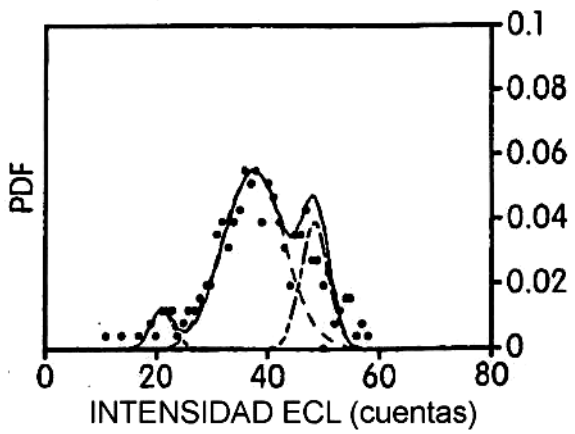
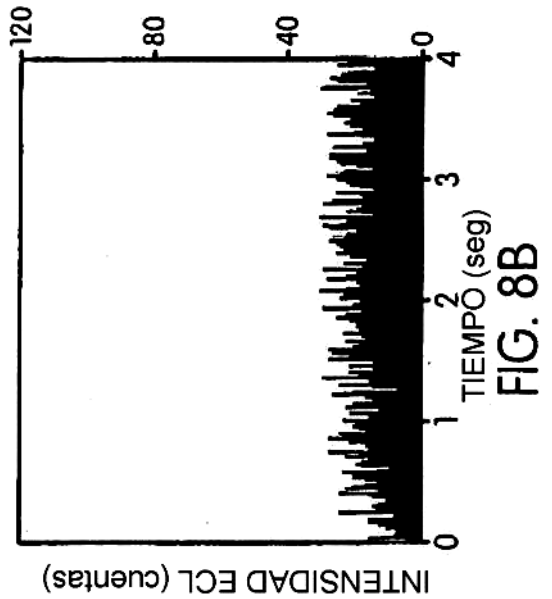
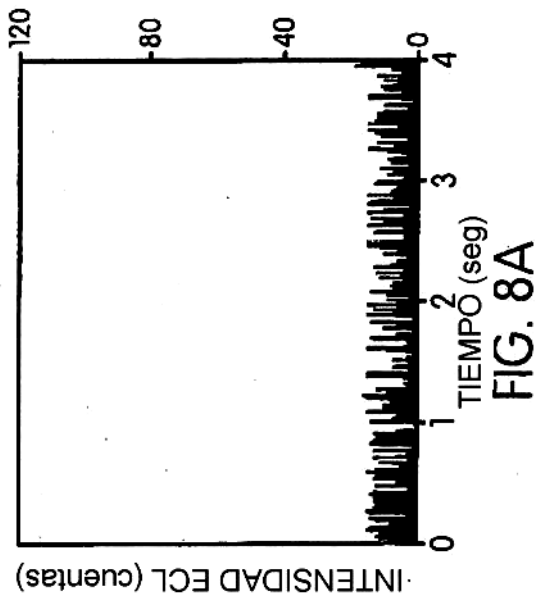
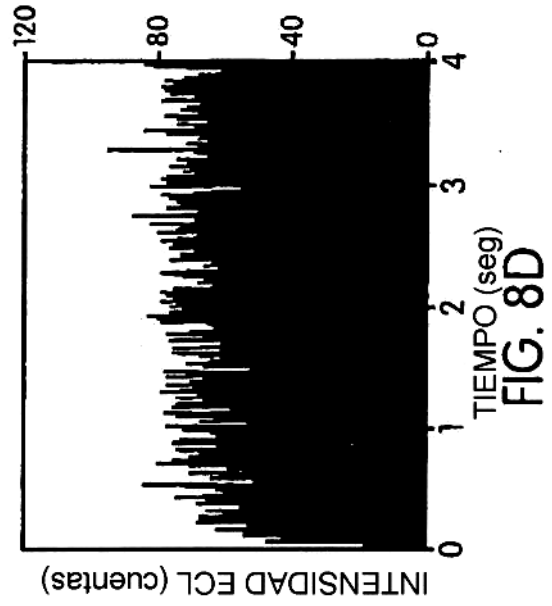
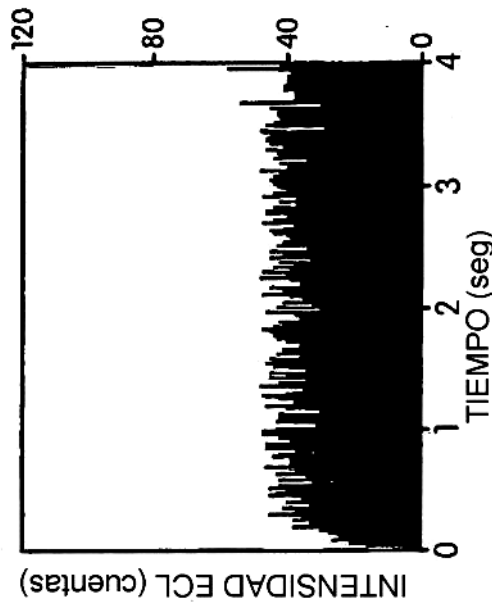


FIG. 7F



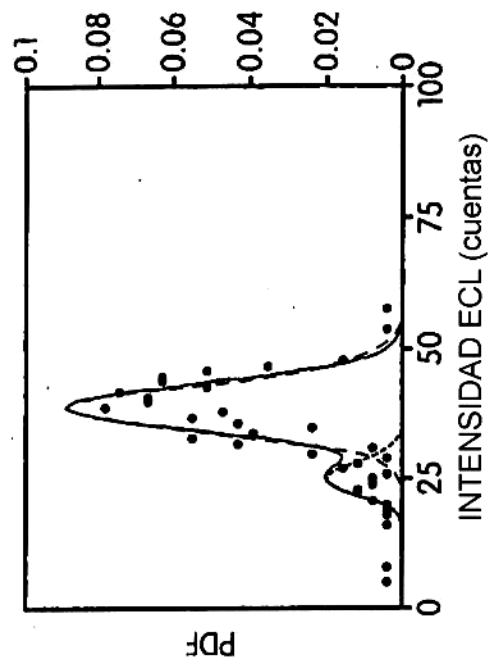


FIG. 9C

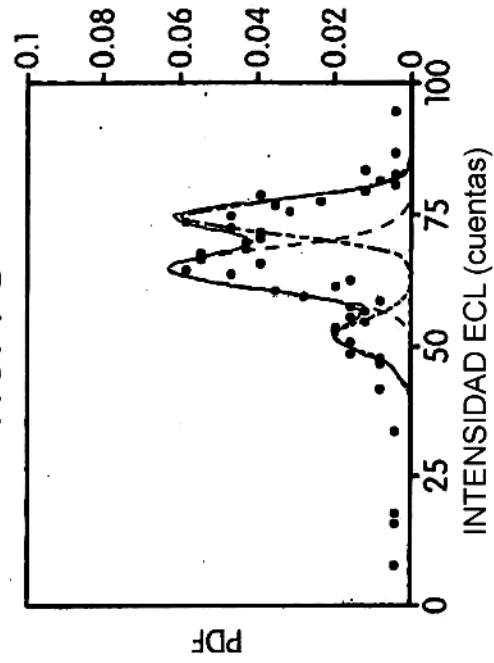


FIG. 9D

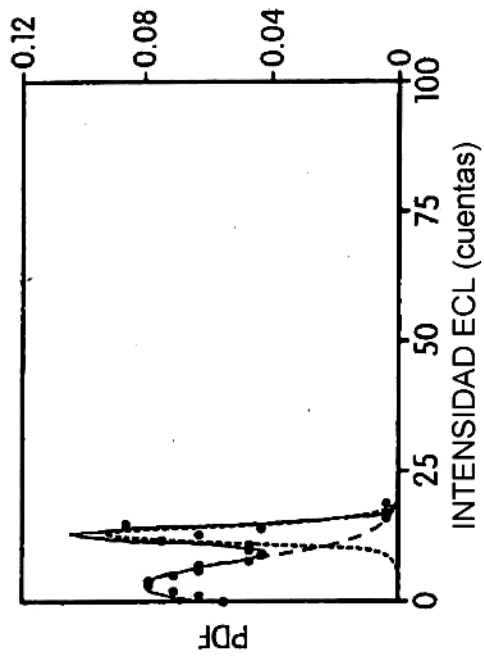


FIG. 9A

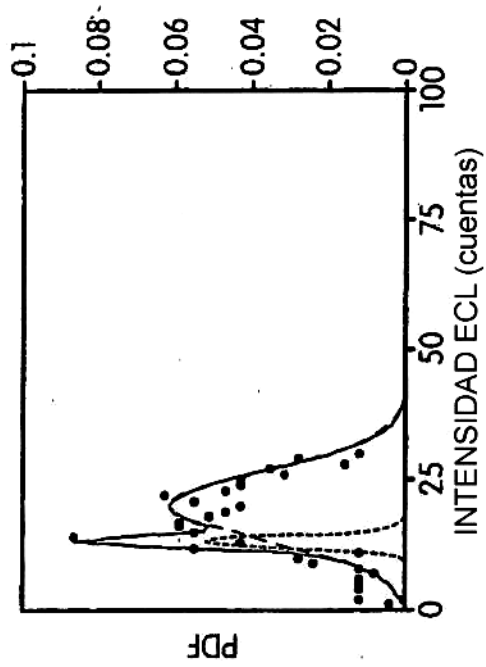


FIG. 9B

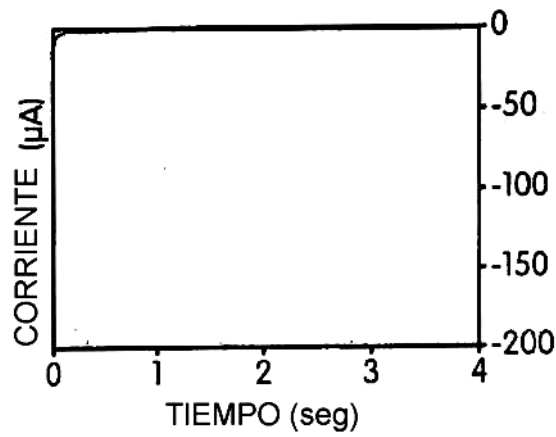


FIG. 10A

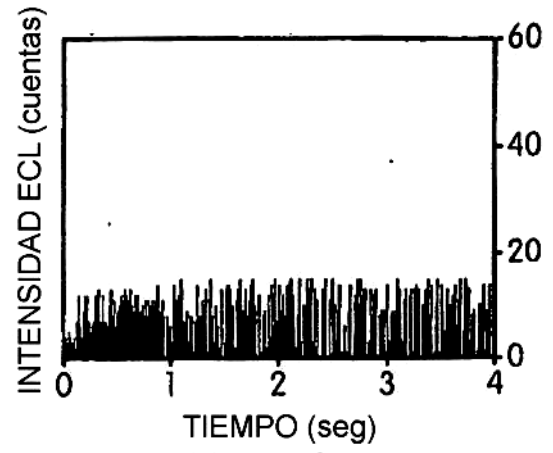


FIG. 10D

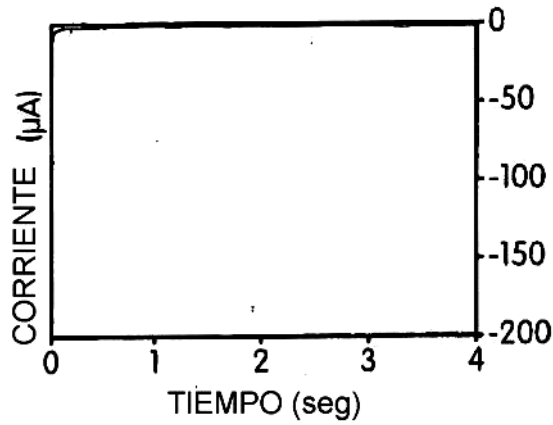


FIG. 10B

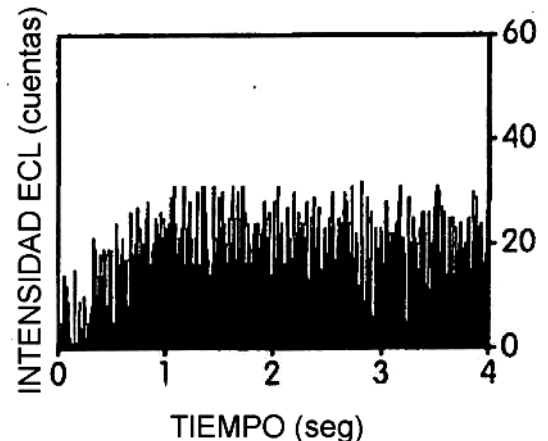


FIG. 10E

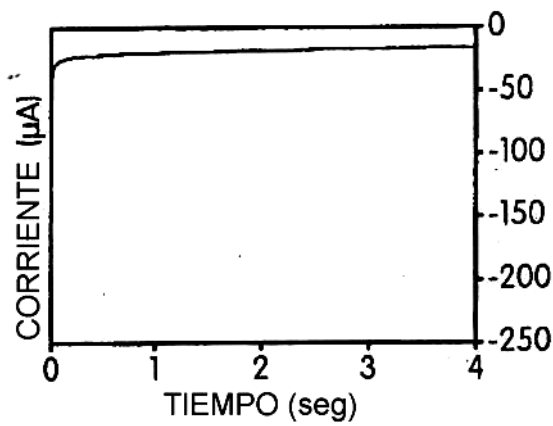


FIG. 10C

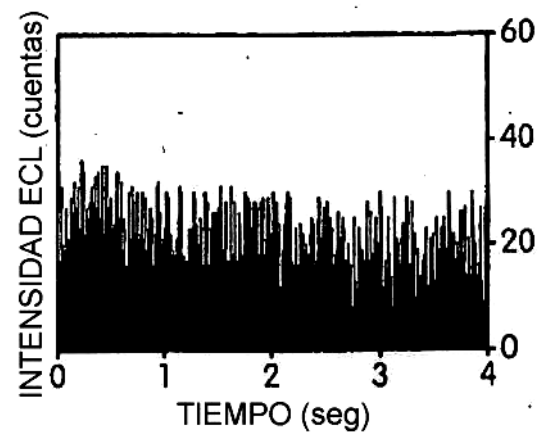


FIG. 10F

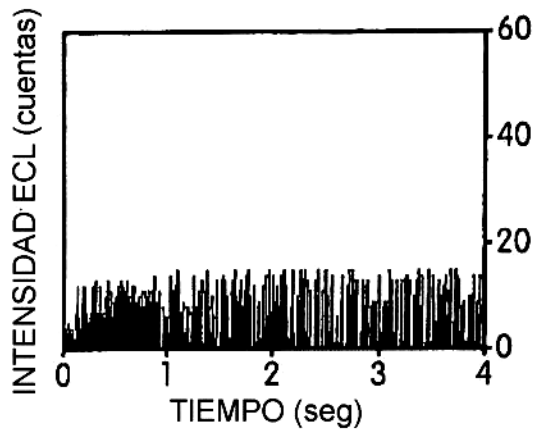


FIG. 11A

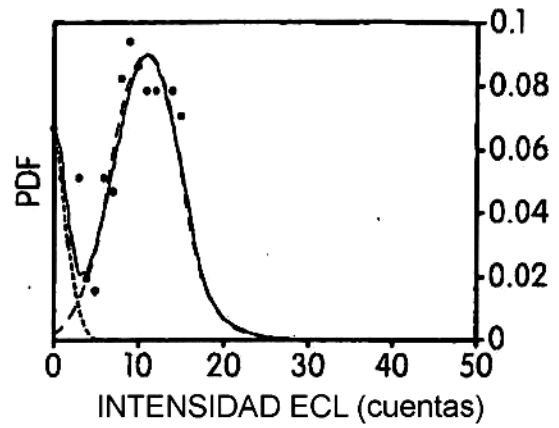


FIG. 11D

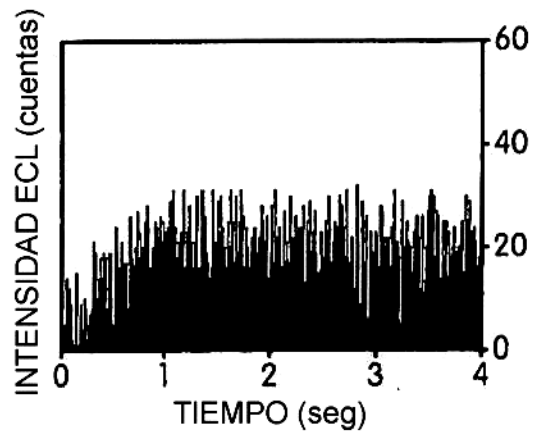


FIG. 11B

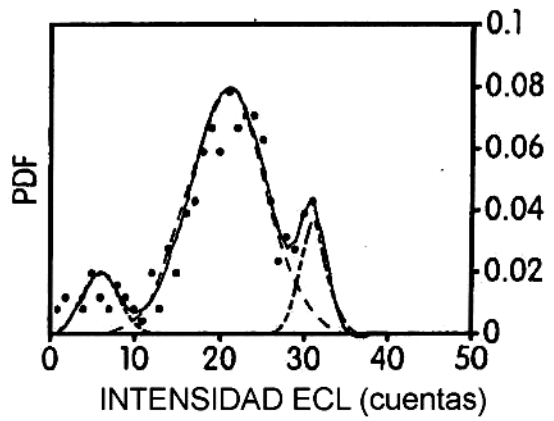


FIG. 11E

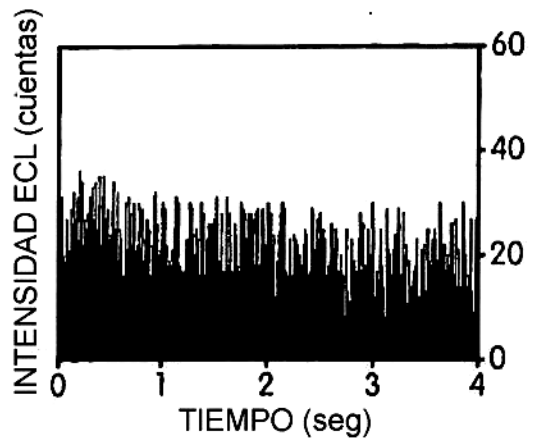


FIG. 11C

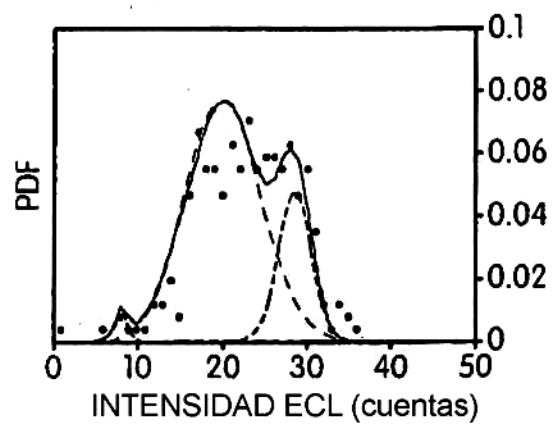


FIG. 11F

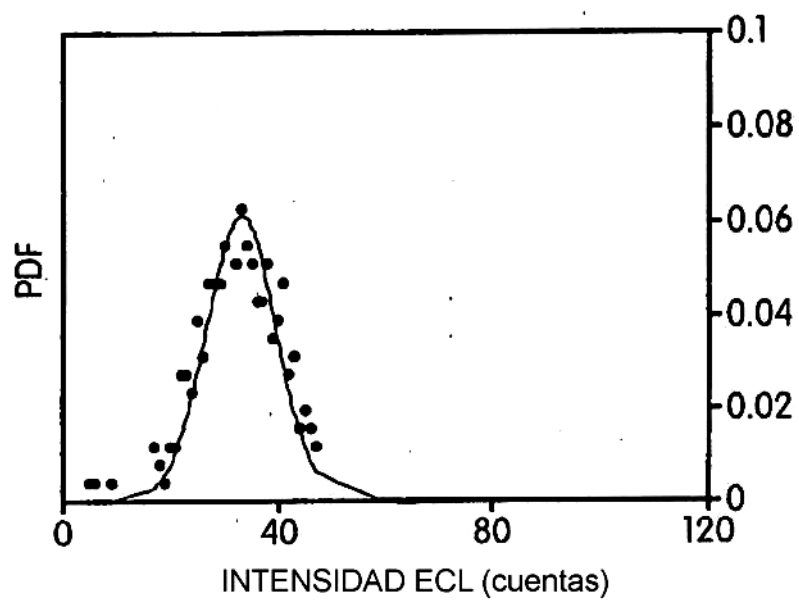


FIG. 12A

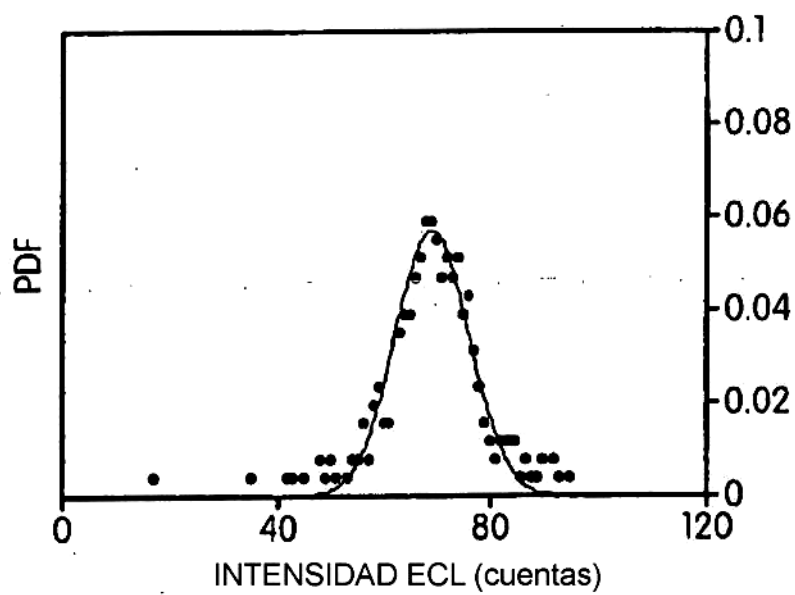


FIG. 12B

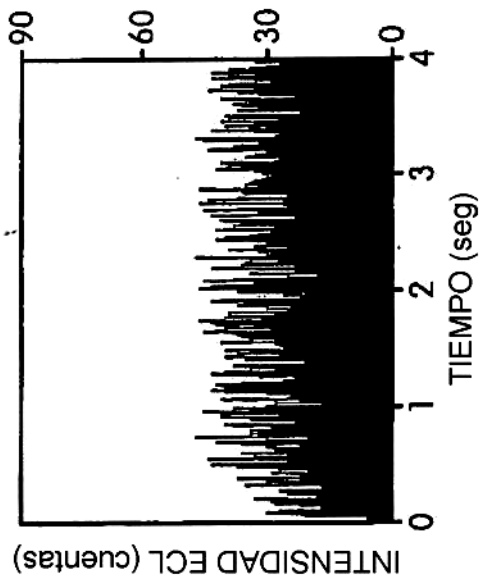


FIG. 13A

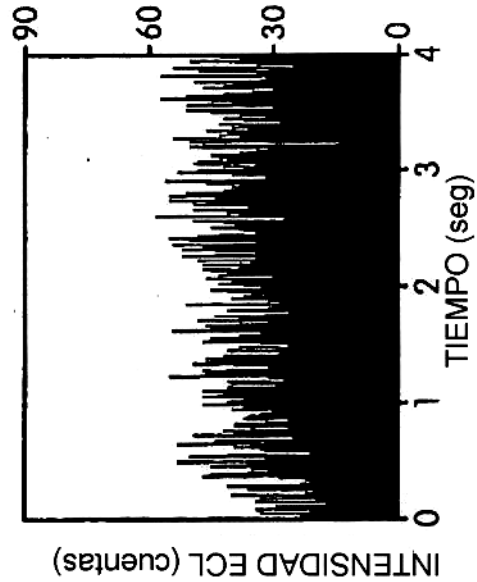


FIG. 13B

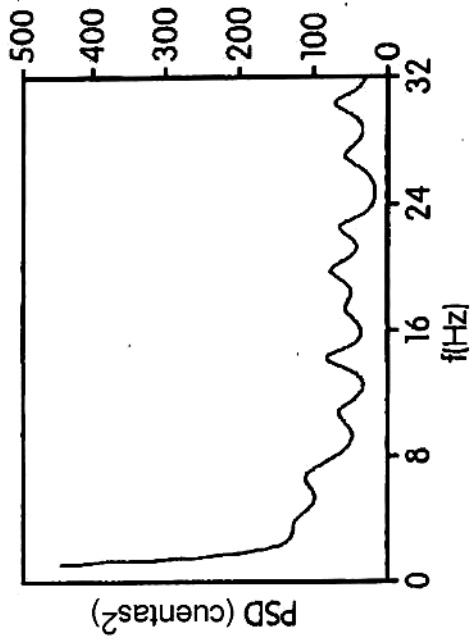


FIG. 13C

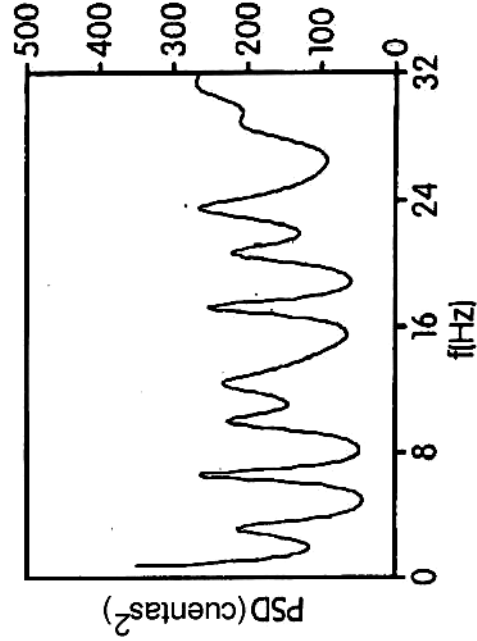


FIG. 13D

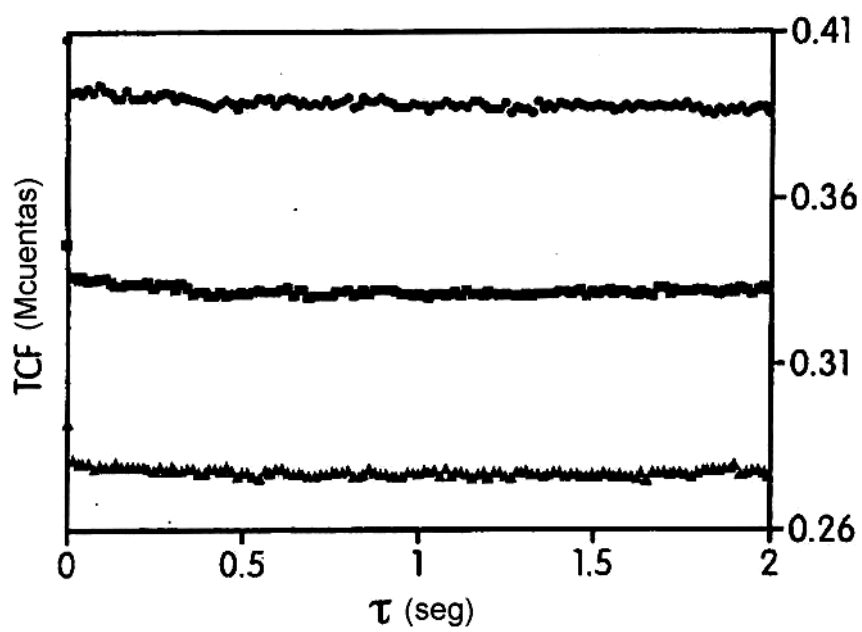
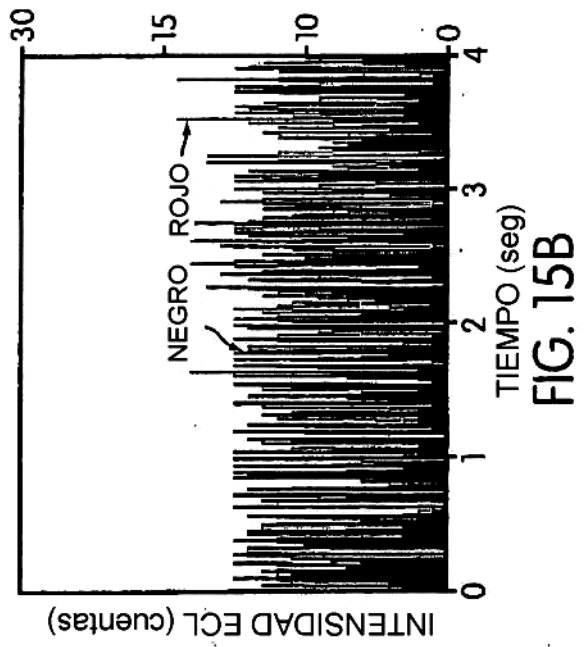
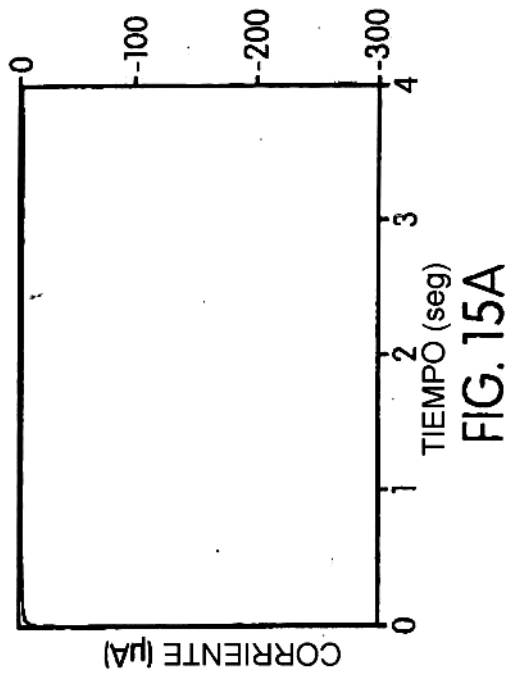
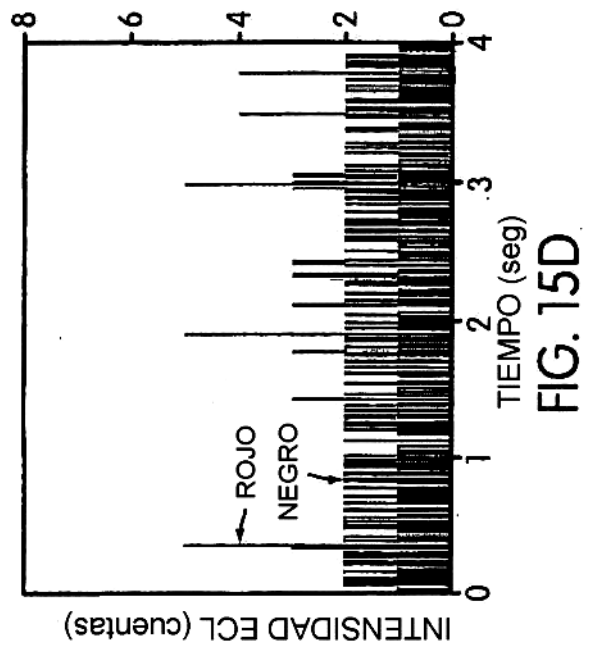
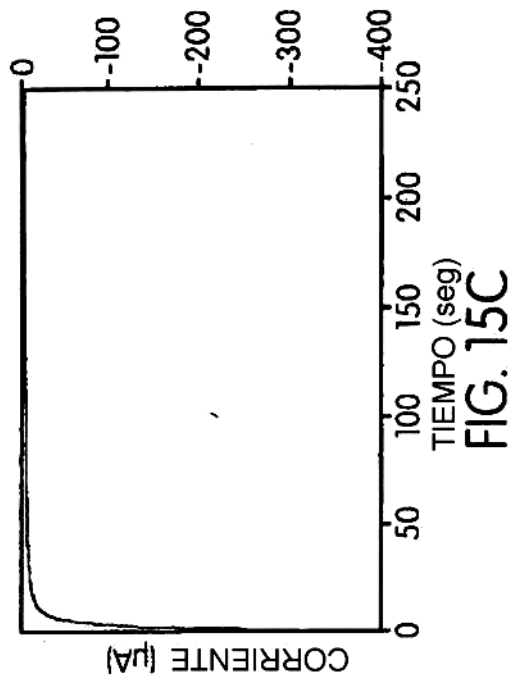


FIG. 14



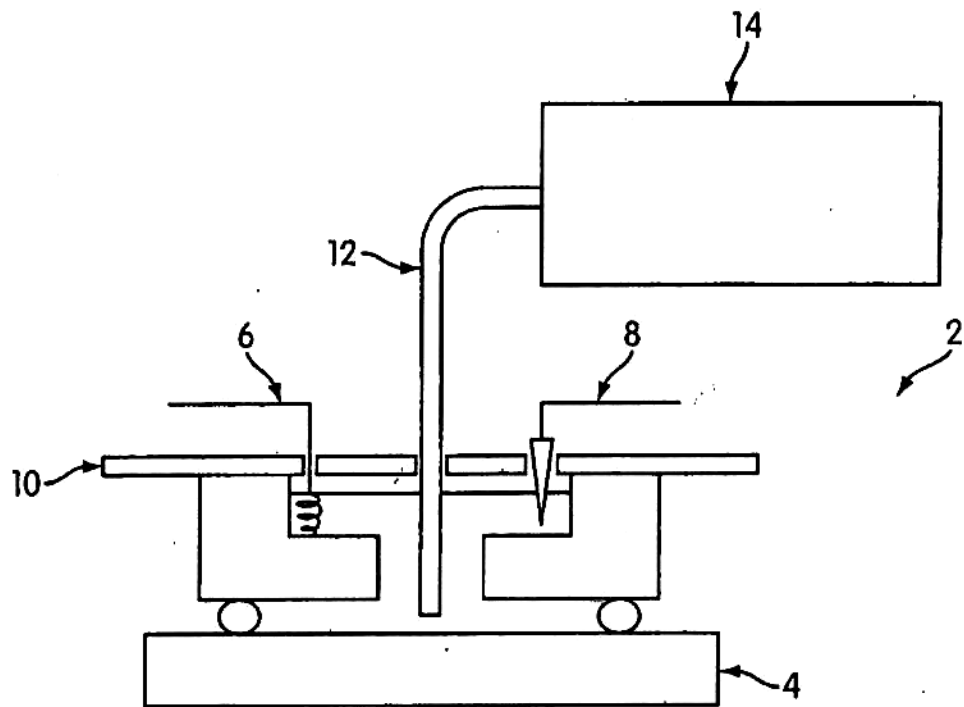


FIG. 16