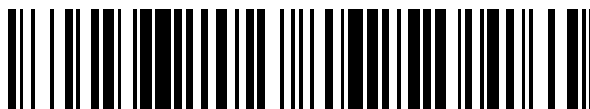


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 044**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/403** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2006 PCT/US2006/021488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2007 WO07053191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2006 E 06844127 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 1893990**

54 Título: **Electroquímica y quimioluminiscencia electrogenerada con un único electrodo faradaico**

30 Prioridad:

**03.06.2005 US 686935 P**

**30.06.2005 US 695163 P**

**17.11.2005 US 737472 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2018**

73 Titular/es:

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

**201 WEST 7TH STREET, SUITE 820  
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**BARD, ALLEN, J. y  
LIU, CHONG-YANG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 675 044 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Electroquímica y quimioluminiscencia electrogenerada con un único electrodo faradaico

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio del número de solicitud provisional de los EE.UU. 60/686.935, presentada el 3 de junio de 2005; número de solicitud provisional de los EE.UU. 60/695.163, presentada el 30 de junio de 2005; y número de solicitud provisional de los EE.UU. 60/737.472, presentada el 17 de noviembre de 2005.

**Campo de la invención**

- 10 La presente invención se refiere a un aparato electroquímico que comprende una célula electroquímica con un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo y métodos de uso de la célula. La célula electroquímica es útil para controlar los productos redox generados y/o el ritmo de generación de los productos redox. En algunas realizaciones, es útil para generar electroquimioluminiscencia y métodos de uso de la misma.

**Antecedentes**

- 20 Los métodos y sistemas de electroquimioluminiscencia (EQL) son útiles en diversas aplicaciones, incluyendo el diagnóstico médico, los ensayos de alimentos y bebidas, la supervisión ambiental, el control de calidad de fabricación, el descubrimiento de fármacos y la investigación científica básica. Existe una serie de instrumentos disponibles en el mercado que utilizan EQL para mediciones analíticas.

- 25 Se han utilizado especies que pueden inducirse para emitir EQL (restos EQL) como marcadores de EQL en diversos procedimientos de ensayo. La luz generada por marcadores de EQL puede usarse como una señal indicadora en procedimientos de diagnóstico (Bard et al., Pat. de los EE.UU. N.º 5.238.808). Por ejemplo, un marcador de EQL puede acoplarse covalentemente a un agente de unión tal como un anticuerpo o una sonda de ácido nucleico, y la participación del reactivo de unión en una interacción de unión puede controlarse mediante la medición de EQL emitida desde el marcador de EQL. Como alternativa, la señal de EQL de un compuesto activo por EQL puede ser indicativa del ambiente químico (véase, por ejemplo, la Pat. de los EE.UU. N.º 5.641.623 que describe ensayos de EQL que controlan la formación o la destrucción de correactivos de EQL).

- 30 Para obtener más antecedentes acerca de EQL, marcadores de EQL, ensayos de EQL e instrumentación para la realización de ensayos de EQL véanse las Pat. de los EE.UU. N.º 5.093.268; 5.147.806; 5.324.457; 5.591.581; 5.597.910; 5.641.623; 5.643.713; 5.679.519; 5.705.402; 5.846.485; 5.866.434; 5.786.141; 5.731.147; 6.066.448; 6.136.268; 5.776.672; 5.308.754; 5.240.863; 6.207.369; y 5.589.136 y los PCT Publicados N.º WO99/63347; W000/03233; WO99/58962; WO99/32662; WO99/14599; WO98/12539; WO97/36931 y WO98/57154.

- 40 Se utilizan ampliamente instrumentos de EQL disponibles en el mercado por razones que incluyen su excelente sensibilidad, intervalo dinámico, precisión y tolerancia de matrices de muestras complejas. Muchos instrumentos disponibles en el mercado usan diseños basados en células de flujo con células de flujo reutilizables permanentes. El uso de una célula de flujo permanente proporciona muchas ventajas, pero también algunas limitaciones, por ejemplo, en la realización del ensayo. En algunas aplicaciones, por ejemplo, el cribado de bibliotecas químicas para determinar fármacos terapéuticos potenciales, la instrumentación de ensayo debería realizar un gran número de análisis a altas velocidades en pequeñas cantidades de muestras.

- 45 Se ha desarrollado diversas técnicas para aumentar el rendimiento del ensayo y reducir el tamaño de la muestra. El uso de placas de ensayo de pocillos múltiples permite el procesamiento y el análisis paralelos de muestras múltiples distribuidas en pocillos múltiples de una placa. Normalmente, se almacenan, procesan y/o analizan muestras y reactivos en placas de ensayo de pocillos múltiples (también conocidas como microplacas o placas de microtitulación). Las placas de ensayo de pocillos múltiples pueden tomar diversas formas, tamaños y formas. Para mayor comodidad, han aparecido algunas normas para determinada instrumentación utilizada para procesar muestras para ensayos de alto rendimiento. Las placas de ensayo de pocillos múltiples normalmente se fabrican en tamaños y formas convencionales y con disposiciones convencionales de los pocillos. Algunas disposiciones de pocillos bien establecidas incluyen las que se encuentran en las placas de 96 pocillos (matriz de pocillos de 12X8), las placas de 384 pocillos (matriz de pocillos de 24X16) y las placas de 1536 pocillos (matriz de pocillos de 48X32). La Society for Biomolecular Screening (Sociedad de Cribado Biomolecular) y ANSI han publicado especificaciones de microplacas para diversos formatos de placa (véase, <http://www.sbsonline.org>).

- 60 Existe una necesidad de sistemas de ensayo de EQL, y sistemas de ensayos basados en otros métodos electroquímicos, que requieran un volumen de muestra inferior y sean menos costosos, más rápidos y más sensibles. Como estos ensayos se mueven a la escala nanométrica para abordar estas necesidades, es cada vez más difícil separar el electrodo de trabajo del contraelectrodo: Como el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se aproximan entre sí en la misma célula, los subproductos redox indeseables formados en el contraelectrodo pueden interactuar con las especies en el electrodo de trabajo.

65

Hasta la fecha, se han utilizado células que usan un electrodo capacitivo y uno faradaico en sistemas de estado sólido, por ejemplo, para inyectar carga en capas delgadas de polímeros orgánicos luminiscentes para ayudar a la observación de propiedades espectroscópicas. En dichos sistemas, un electrodo entra en contacto con la capa de polímero y el otro electrodo es una pequeña punta separada de la capa de polímero por una capa aislante de ~10 nm de impurezas o aire. Véase, por ejemplo, Adams, et al., *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 6728. Estas células no son células electroquímicas, no usan una solución electrolítica y no están diseñadas para contener una solución electrolítica. Se han usado configuraciones que implican un electrodo capacitivo y uno de referencia para examinar los efectos de doble capa. Véase, por ejemplo, Grahame, *Chem. Rev.*, 1947, 41, 441. Estos estudios se centran en la importancia del electrodo polarizado. Cualesquier efectos faradaicos en el electrodo de referencia no eran de interés y se despreciaron.

El documento US 5.500.188 A se refiere a un dispositivo para la detección y la discriminación fotosensibles. Hay elementos indicadores fotosensibles desvelados, así como circuitos y métodos que implican la medición de señales eléctricas resultado de la irradiación a uno o más sitios, cuando las señales varían en relación con el medio de cada sitio. Como se muestra en la figura 1, un circuito comprende un elemento semiconductor en la superficie de un medio acuoso, así como un electrodo de referencia y un electrodo de control que están ambos en contacto con el medio acuoso. Un potenciostato suministra una corriente polarizadora a través del electrodo de control y el electrodo indicador de manera que se cargue de forma capacitiva una capa aislante que mantiene un potencial constante entre el electrodo indicador y el electrodo de referencia. Un flujo de luz al electrodo se produce por medio de un LED u otros fenómenos tales como la fluorescencia o la quimioluminiscencia. Este flujo de luz produce señales analizables, donde cada una de las señales está relacionada con el volumen de medio asociado al sitio de irradiación.

*Journal of Vacuum Science & Technology A*, vol. 12, N.º 4, julio de 1994, páginas 1882-1885, ISSN 0734-2101, Xueping Xu et al. "*Electrochemical Study of ultra-thin silica films supported on platinum substrate*" se refiere a un estudio acerca de la química electroquímica acuosa de película de sílice ultradelgada soportada sobre sustratos metálicos. De acuerdo con este documento se describe un aparato que combina una cámara de análisis de ultra-alto vacío con una célula electroquímica. Los electrodos de sílice/Pt se comportan como idealmente polarizables en un amplio intervalo de potenciales, lo que facilita estudios electroquímicos de partículas metálicas soportadas de Pd y Pt.

El documento WO 99/14597 A desvela un aparato para la determinación electroquímica de iones metálicos. El aparato comprende un sensor de afinidad de capacidad específico de iones metálicos que comprende una superficie de metal noble completamente cubierta con una monocapa autoensamblada. La monocapa incluye grupos de afinidad que se unen específicamente a un determinado ion de metal pesado de interés. El sensor se inserta en una célula que puede ser ya sea del tipo de cubeta o una célula de flujo. La célula contiene adicionalmente un electrodo auxiliar, normalmente una lámina de platino, colocado de forma simétrica y opuesta al electrodo de medición y un electrodo de referencia, normalmente SCE o Ag/AgCl colocado en la célula de manera que la caída de tensión entre los electrodos de referencia y de medición debido a corrientes capacitivas o de Faraday se vuelva muy pequeña. Tras poner en contacto la muestra líquida que comprende el ion de metal pesado de interés, se determina el cambio de capacitancia del sensor.

El documento US 5.428.893 A desvela un dispositivo pseudocapacitivo mejorado utilizado en sistemas similares a baterías convencionales que tiene electrodos diferentes. El dispositivo incluye un primer electrodo, un segundo electrodo y un separador dispuesto operativamente entre los electrodos primero y segundo. Entre los electrodos también se dispone un electrolito que es ya sea acuoso o no acuoso.

*Applied Physics Letters*, vol. 78, n.º 9, 26 de febrero de 2001, páginas de 1291 a 1293, ISSN 0003-3951 Krüger M et al. "*Electrochemical carbon nanotube field-effect transistor*" presenta un estudio de efecto de campo eléctrico de nanotubos de carbono en electrolitos. Debido a la gran capacitancia de compuerta pueden inducirse cambios de energía de Fermi que permiten afinar nanotubos de carbono del tipo p al tipo n.

*Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, n.º 48, 4 de diciembre de 2002, página de 14478 a 14485, ISSN 002-7863, Miao Wujian et al. "*Electrogenerated chemiluminescence 69*" ... citado en la solicitud.

El documento US 6.200.531 B1 desvela un módulo capaz de realizar mediciones de EQL. Un módulo en particular incluye una célula de flujo que comprende un detector óptico para detectar luz emitida por marcadores de EQL que incluyen derivados de trisbipiridilo de rutenio (Ru(bpy)). El módulo comprende adicionalmente un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. El electrodo de referencia incluye una frita cerámica o de vidrio junto con un medio de transferencia iónica.

El documento (WO 83/01687 A) desvela un instrumento para la medición de la concentración de materiales electroactivos en una célula electrolítica, en particular para la medición de niveles de oxígeno disuelto. Con el fin de evitar, por ejemplo, los efectos del agotamiento de la oxidación, se usa un instrumento de electroanálisis pulsado que incluye medios para cancelar el efecto de la corriente capacitiva y permite la medición precisa de la corriente faradaica que fluye durante cada pulso.

Sigue existiendo la necesidad de un aparato electroquímico que reduzca la introducción de subproductos generados electroquímicamente indeseables en la muestra.

Sigue existiendo la necesidad de un aparato electroquímico que controle por separado el ritmo de generación de productos de oxidación y reducción.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un aparato que comprende una célula electroquímica de acuerdo con la reivindicación 1.

También se proporcionan métodos de determinación de la presencia o cantidad de un analito en una muestra usando el aparato, de acuerdo con la reivindicación 16.

En este método y cualesquier métodos desvelados o reivindicados en el presente documento, los electrodos faradaico y capacitivo pueden ponerse en contacto con la solución electrolítica o de muestra en cualquier orden.

## Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** Diagrama esquemático que muestra el sistema de Pt/agua/SiO<sub>2</sub>/Si con la posibilidad de movimiento lateral de la punta para generar superficie de contacto nueva. La punta se unió a una platina de traslado que podría moverse con un motor de oruga agrimensora, un micrómetro o a mano.

**Figura 2.** Corriente de carga en función del tiempo en un sistema de Pt/agua/SiO<sub>2</sub>/Si con una polarización de 1 V aplicada entre Pt y Si. Después de que la corriente de carga alcanzó el valor basal, el circuito se desconectó durante aproximadamente 8 s y se volvió a conectar de nuevo todavía con la misma polarización; solo se observó una corriente de carga muy pequeña como se muestra en el recuadro.

**Figura 3.** Corriente de carga registrada durante el movimiento relativo con una polarización de -1 V aplicada entre Pt y Si en un sistema de Pt/agua/SiO<sub>2</sub>/Si. Velocidad de barrido lateral, ~1 cm/s. Recuadro: Corriente de carga en función de la polarización con punta estacionaria a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

**Figura 4.** Corriente de carga, como en la figura 3 durante etapas repetidas, es decir, un movimiento lateral de parada y avance, con una polarización constante de -1 V entre Pt y Si. La corriente aumentaba cuando comenzaba el movimiento de la gota de agua y disminuía cuando el movimiento se detenía, con una corriente de carga en estado estacionario breve durante el movimiento.

**Figura 5.** Corriente de carga (parte inferior) y quimioluminiscencia electrogenerada (arriba) producidas en el sistema de Pt/agua/SiO<sub>2</sub>/Si con pulsos de potencial aplicados continuos de 1,4 V a -0,5 V entre Pt y Si, en Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 0,5 mM acuoso, tripropilamina 0,10 M (TPA) y tampón Tris 0,10 M/LiClO<sub>4</sub> 0,10 M (pH = 8). Recuadro: Micrografía de una imagen de EQL de una punta de Pt 25 µm obtenida con un microscopio óptico en un experimento separado con el mismo sistema con una polarización de 1,4 V.

**Figura 6.** Diagrama esquemático que muestra un contraelectrodo impulsado por motor, bloqueado, en movimiento, por ejemplo, un cable conductor o cinta recubierta con una capa aislante, a través de una solución que contiene un electrolito con una polarización para producir una reacción faradaica continua en el electrodo de trabajo.

## Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción se refiere a los dibujos adjuntos en los que, en ausencia de una representación contraria, los mismos números en diferentes dibujos representan elementos similares. Las implementaciones en la siguiente descripción no representan todas las implementaciones coherentes con los principios de la invención reivindicada. En cambio, son meramente algunos ejemplos de sistemas y métodos coherentes con estos principios. Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

### I. Definiciones

Como se usan en la presente memoria descriptiva, las siguientes palabras y frases tienen por objeto en general tener los significados que se exponen a continuación, excepto en la medida que el contexto en el que se usan indique lo contrario. Estas definiciones se ubican en esta sección para la comodidad del lector. Las definiciones para otros términos, palabras y frases, que pueden encontrarse en otras secciones de la presente solicitud, también describen los significados previstos, excepto en la medida que el contexto en el que se usan indique lo contrario.

#### A. Definiciones generales

El término "alifático", como se usa en el presente documento, se define como en *The American Heritage® Dictionary of the English Language*, Cuarta Edición, Copyright © 2000 y abarca compuestos químicos orgánicos en los que los átomos de carbono están unidos en cadenas abiertas. Las cadenas abiertas comprenden de 1 a 20 átomos de carbono o de 1 a 13 o de 1 a 6 átomos de carbono. Cuando un grupo alifático es insaturado puede haber de 1 a 10 o

de 1 a 6 o de 1 a 3 puntos de insaturación. El número de átomos de carbono en un grupo alifático puede indicarse mediante un subíndice en una "C" (por ejemplo, "alifático C<sub>3</sub>" representa un grupo alifático que comprende 3 átomos de carbono). Análogamente, pueden expresarse intervalos en el subíndice. Por ejemplo, "alifático C<sub>1-10</sub>" abarca grupos alifáticos de 1 a 10 átomos de carbono inclusive. Los ejemplos de grupos alifáticos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 2-pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 3-metilpentilo, eteno, propeno, etino, buteno, propino, butino y similares. Cuando un grupo alifático que tiene un número específico de carbonos se nombra usando la notación C subindicada, todos los isómeros que tienen ese número de carbonos tienen por objeto estar incluidos. Los grupos alifáticos pueden estar opcionalmente sustituidos con al menos un grupo funcional hidrófilo, como se define en el presente documento.

Además, los grupos alifáticos útiles como restos EQL y como correactivos de EQL también pueden comprender grupos funcionales adicionales y pueden tener puntos de unión únicos (es decir, ligando monodentado) o múltiples (es decir, ligandos bidentados o polidentados). Dichos grupos alifáticos son bien conocidos en la técnica y se describen en *Electrogenerated Chemiluminescence*, Bard, Editor, Marcel Dekker, (2004); Knight, A y Greenway, G. *Analyst* 119: 879-890 1994.

La expresión "grupo funcional hidrófilo" se refiere a un grupo funcional que facilita o que aumenta la solubilidad de una molécula en agua. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como hidroxilo (-OH), aldehído (-C(O)H), hidroxycarbonilo (-C(OH)(C=O)H), amino (-NH<sub>2</sub>), aminocarbonilo (-CONH<sub>2</sub>), amidina (-C(=NH)NH<sub>2</sub>), imino (-C=NH), ciano (-CN), nitro (-NO<sub>2</sub>), nitrato (-NO<sub>3</sub>), sulfato (-SO<sub>4</sub>), sulfonato (-SO<sub>3</sub>H), fosfato (-PO<sub>4</sub>), fosfonato (-PH<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), silicato (-SiHO<sub>3</sub>), carboxilato (-COOH), borato (-BH<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), guanidinio (-HN-C(=NH)-NH<sub>2</sub>), carbamida (-HNC(O)NH<sub>2</sub>), carbamato (-HNC(O)NH<sub>2</sub>), carbonato (CO<sub>3</sub>), sulfamida (-S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), sililo (-SiH<sub>3</sub> y/o -Si(OH)<sub>3</sub>), siloxi (-OSiH<sub>3</sub> y/o -OSi(OH)<sub>3</sub>), amida y similares.

La expresión "compañero de unión", como se usa en el presente documento, significa una sustancia que puede unirse específicamente a un analito de interés. En general, la unión específica se caracteriza por una afinidad relativamente alta y una capacidad relativamente baja a moderada. La unión no específica por lo general tiene una baja afinidad con una capacidad moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad Ka es superior a aproximadamente 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. Por ejemplo, la unión puede considerarse específica cuando la constante de afinidad Ka es superior a aproximadamente 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>. Una constante de afinidad más alta indica mayor afinidad y, por tanto, normalmente mayor especificidad. Por ejemplo, los anticuerpos normalmente se unen a antígenos con una constante de afinidad en el intervalo de 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> a 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> o superior.

Los ejemplos de compañeros de unión incluyen secuencias de ácido nucleico complementarias (por ejemplo, dos secuencias de ADN que se hibridan entre sí, dos secuencias de ARN que se hibridan entre sí; una secuencia de ADN y una de ARN que se hibridan entre sí), un anticuerpo y un antígeno, un receptor y un ligando (por ejemplo, TNF y TNFr-I, CD142 y Factor Vila, B7-2 y CD28, VIH-1 y CD4, ATR/TEM8 o CMG y el resto antigénico protector de la toxina del ántrax), una enzima y un sustrato o una molécula y una proteína de unión (por ejemplo, vitamina B12 y factor intrínseco, folato y proteína de unión a folato).

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos son un ejemplo de un compañero de unión. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa una inmunoglobulina o una parte de la misma y abarca cualquier polipéptido (con o sin modificación adicional mediante restos de azúcar (mono y polisacáridos)) que comprenda un sitio de unión al antígeno independientemente de la fuente, método de producción u otras características. El término incluye, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, humanizados, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados e injertados con CDR, así como proteínas de fusión. Una parte de un anticuerpo puede incluir cualquier fragmento que pueda unirse a antígeno, incluyendo, pero no limitado a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>ab</sub>, F<sub>v</sub>, ScFv, Fd, V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.

Hay disponible un gran número de anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes analitos de interés, como se ejemplifica en los listados en diversos catálogos, tales como: *Biochemicals and Reagents for Life Science Research*, Sigma-Aldrich Co., apartado postal 14508, San Luis, Mo., 63178 (1999); el catálogo de Life Technologies, Life Technologies, Gaithersburg, Md.; y el catálogo de Pierce, Pierce Chemical Company, apartado postal 117, Rockford, Ill. 61105 (1994).

Otros anticuerpos monoclonales de ejemplo incluyen los que se unen específicamente a β-actina, ADN, digoxina, insulina, progesterona, marcadores leucocitarios humanos, interleucina 10 humana, interferón humano, fibrinógeno humano, p53, virus de la hepatitis B o una porción del mismo, virus VIH o una porción del mismo, factor de necrosis tumoral o FK-506. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se selecciona entre anticuerpos que se unen específicamente a al menos uno de T4, T3, T3 libre, T4 libre, TSH (hormona estimulante de la tiroides), tiroglobulina, receptor de TSH, prolactina, LH (hormona luteinizante), FSH (hormona estimulante del folículo), testosterona, progesterona, estradiol, hCG (gonadotropina coriónica humana), hCG+β, SHBG (globulina de unión a hormonas sexuales), DHEA-S (sulfato de deshidroepiandrosterona), hGH (hormona del crecimiento humana), ACTH (hormona adrenocorticotrófica), cortisol, insulina, ferritina, ácido fólico, GR (glóbulos rojos) ácido fólico, vitamina B12, vitamina D, péptido C, troponina T, CK-MB (creatina quinasa-mioglobina), mioglobina, pro-BNP (péptido natriurético cerebral), HbsAg (antígeno de superficie de hepatitis B), HBeAg (antígeno de hepatitis Be), antígeno del VIH, combinado de VIH, H. pylori, β-CrossLaps, osteocalcina, PTH (hormona paratiroidea), IgE, digoxina, digitoxina, AFP (α-

fetoproteína), CEA (antígeno carcinoembrionario), PSA (antígeno prostático específico), PSA libre, CA (antígeno de cáncer) 19-9, CA 12-5, CA 72-4, cyfra 21-1, NSE (enolasa específica de neurona), S-100, P1NP (procolágeno de tipo 1 N-propéptido), PAPP-A (proteína plasmática A asociada al embarazo), Lp-PLA2 (fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína), sCD40L (ligando de CD40 soluble), IL 18 y survivina.

Otros anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo incluyen anti-TPO (anticuerpo de peroxidasa antitiroidea), anti-HBc (antígeno de Hepatitis Bc), anti-HBc/IgM, anti-HAV (virus de la hepatitis A), anti-HAV/IgM, anti-HCV (virus de la hepatitis C), anti-VIH, anti-p-24 del VIH, anti-IgG de rubéola, anti-IgM de rubéola, anti-IgG de toxoplasmosis, anti-IgM de toxoplasmosis, anti-IgG de CMV (citomegalovirus), anti-IgM de CMV, anti-HGV (virus de la hepatitis G) y anti-HTLV (virus linfotrópico T humano).

Los ejemplos adicionales de compañeros de unión incluyen proteínas de unión, por ejemplo, la proteína de unión a vitamina B12, las proteínas de unión al ADN tales como las superclases de dominios básicos, dominios de unión a ADN coordinadores de cinc, hélice-vuelta-hélice, factores de armazón beta con contactos de surco menor y otros factores de transcripción que no son anticuerpos.

La expresión "compañero de unión marcado", como se usa en el presente documento, significa un compañero de unión que está marcado con un átomo, resto, grupo funcional o una molécula capaz de generar, modificar o modular una señal detectable. Por ejemplo, en un ensayo radioquímico, el compañero de unión marcado puede estar marcado con un isótopo radiactivo de yodo. Como alternativa, el anticuerpo compañero de unión marcado puede estar marcado con una enzima, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante que puede usarse en un ensayo colorimétrico. El compañero de unión marcado también puede estar marcado con un fluoróforo, tal como uno útil en mediciones de fluorescencia, mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo o mediciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (TERF). Se desvelan indicadores de ejemplo en Hemmila, et al., *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 26, páginas 283-290 (1993); Kakabakos, et al., *Clin. Chem.*, Vol. 38, páginas 338-342 (1992); Xu, et al., *Clin. Chem.*, páginas 2038-2043 (1992); Hemmila, et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Vol. 48, páginas 389-400 (1988); *Bioluminescence and Chemiluminescence Proceedings of the 9th International Symposium 1996*, J. W. Hastings, et al., editores, Wiley, Nueva York, 1996; *Bioluminescence and Chemiluminescence Instruments and Applications*, Knox Van dyre, Ed., CRC Press, Boca Ratón, 1985; I. Hemmila, *Applications of Fluorescence in Immunoassays, Chemical Analysis*, Volumen 117, Wiley, Nueva York, 1991; y Blackburn, et al., *Clin. Chem.*, Vol. 37, página 1534 (1991).

Otros ejemplos de compañeros de unión marcados incluyen compañeros de unión que se marcan con un resto (resto EQL), grupo funcional o molécula electroquimioluminiscente que es útil para generar una señal en un ensayo de electroquimioluminiscencia (EQL). El resto EQL puede ser cualquier compuesto que pueda inducirse para emitir repetidamente la radiación electromagnética mediante exposición directa a una fuente de energía eléctrica. Dichos restos, grupos funcionales o moléculas se desvelan en las Pat. de los EE.UU. N.º 5.962.218; 5.945.344; 5.935.779; 5.858.676; 5.846.485; 5.811.236; 5.804.400; 5.798.083; 5.779.976; 5.770.459; 5.746.974; 5.744.367; 5.731.147; 5.720.922; 5.716.781; 5.714.089; 5.705.402; 5.700.427; 5.686.244; 5.679.519; 5.643.713; 5.641.623; 5.632.956; 5.624.637; 5.610.075; 5.597.910; 5.591.581; 5.543.112; 5.466.416; 5.453.356; 5.310.687; 5.296.191; 5.247.243; 5.238.808; 5.221.605; 5.189.549; 5.147.806; 5.093.268; 5.068.088; 5.061.445; y 6.808.939; Dong, L. et al., *Anal. Biochem.*, vol. 236, páginas 344-347 (1996); Blohm, et al., *Biomedical Products*, vol. 21, N.º 4: 60 (1996); Jameison, et al., *Anal. Chem.*, vol. 68, páginas 1298-1302 (1996); Kibbey, et al., *Nature Biotechnology*, vol. 14, n.º 3, páginas 259-260 (1996); Yu, et al., *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n.º 2, páginas 587-592 (1996); Williams, *American Biotechnology*, página 26 (enero, 1996); Darsley, et al., *Biomedical Products*, vol. 21, n.º 1, página 133 (enero, 1996); Kobrynski, et al., *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 3, n.º 1, páginas 42-46 (enero de 1996); Williams, *IVD Technology*, páginas 28-31 (noviembre, 1995); Deaver, *Nature*, vol. 377, páginas 758-760 (26 de octubre, 1995); Yu, et al., *BioMedical Products*, vol. 20, n.º 10, página 20 (octubre, 1995); Kibbey, et al., *BioMedical Products*, vol. 20, n.º 9, página 116 (septiembre, 1995); Schutzbank, et al., *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, páginas 2036-2041 (agosto, 1995); Stern, et al., *Clinical Biochemistry*, vol. 28, páginas 470-472 (August, 1995); Carlowicz, *Clinical Laboratory News*, vol. 21, n.º 8, páginas 1-2 (agosto de 1995); Gatto-Menking, et al., *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, páginas 501-507 (julio, 1995); Yu, et al., *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, vol. 10, páginas 239-245 (1995); Van Gemen, et al., *Journal of Virology Methods*, vol. 49, páginas 157-168 (1994); Yang, et al., *Bio/Technology*, vol. 12, páginas 193-194 (1994); Kenten, et al., *Clinical Chemistry*, vol. 38, páginas 873-879 (1992); Kenten, *Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules*, Kessler, Ed., Springer, Berlín, páginas 175-179 (1992); Gudibande, et al., *Journal of Molecular and Cellular Probes*, vol. 6, páginas 495-503 (1992); Kenten, et al., *Clinical Chemistry*, vol. 37, páginas 1626-1632 (1991); Blackburn, et al., *Clinical Chemistry*, vol. 37, páginas 1534-1539 (1991), *Electrogenerated Chemiluminescence*, Bard, Editor, Marcel Dekker, (2004), y Patente de los EE.UU. N.º 5.935.779. En ciertas realizaciones, el grupo electroquimioluminiscente puede comprender un metal, tal como rutenio u osmio. En ciertas realizaciones, el compañero de unión puede marcarse con un resto de rutenio, tal como un grupo tris-bipiridil-rutenio tal como tris-bipiridina de rutenio (II) ([Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>).

El término "analito", como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o agregado de moléculas, incluyendo una célula o un componente celular de un virus, que se encuentra en una muestra. Los ejemplos de analitos a los que el compañero de unión puede unirse específicamente incluyen toxinas bacterianas, virus,

bacterias, proteínas, hormonas, ADN, ARN, fármacos, antibióticos, toxinas nerviosas y metabolitos de los mismos. En el alcance del término "analito" también se incluyen fragmentos de cualquier molécula que se encuentra en una muestra. Un analito puede ser un compuesto orgánico, un compuesto organometálico o un compuesto inorgánico. Un analito puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, DNA, RNA, un plásmido, un vector o un oligonucleótido), una proteína (por ejemplo, un anticuerpo, un antígeno, un receptor, un ligando de receptor o un péptido), una lipoproteína, una glucoproteína, una ribonucleoproteína o desoxirribonucleoproteína, un péptido, un polisacárido, un lipopolisacárido, un lípido, un ácido graso, una vitamina, un aminoácido, un compuesto farmacéutico (por ejemplo, tranquilizantes, barbitúricos, opiáceos, alcoholes, antidepresivos tricíclicos, benzodiacepinas, antiviricos, antifúngicos, antibióticos, esteroides, glicósidos cardíacos o un metabolito de cualquiera de los anteriores), una hormona, un factor de crecimiento, una enzima, una coenzima, un apoenzima, un hapteno, una lectina, un sustrato, un metabolito celular, un componente celular u orgánulo (por ejemplo, una membrana, una pared celular, un ribosoma, un cromosoma, una mitocondria o un componente del citoesqueleto). En la definición también se incluyen toxinas, pesticidas, herbicidas y contaminantes ambientales. La definición incluye, adicionalmente, complejos que comprenden uno o más de cualquiera de los ejemplos que se exponen en esta definición.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen patógenos bacterianos tales como *Aeromonas hydrophila* y otras especies (spp.); *Bacillus Anthracis*; *Bacillus cereus*; especies productoras de toxina botulínica de *Clostridium*; *Brucella abortus*; *Brucella melitensis*; *Brucella suis*; *Burkholderia mallei* (formalmente *Pseudomonas mallei*); *Burkholderia pseudomallei* (anteriormente *Pseudomonas pseudomallei*); *Campylobacter jejuni*; *Chlamydia psittaci*; *Clostridium botulinum*; *Clostridium perfringens*; *Cowdria ruminantium* (Cowdriosis); *Coxiella burnetii*; grupo de *Escherichia coli* enterovirulenta (Grupo CEE), tal como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica (EHEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC); *Ehrlichia* spp. tales como *Ehrlichia chaffeensis*; *Francisella tularensis*; *Legionella pneumophila*; *Liberobacter africanus*; *Liberobacter asiaticus*; *Listeria monocytogenes*; diversas bacterias entéricas, tales como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Aerobacter*, *Providencia* y *Serratia*; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycoplasma capricolum*; *Mycoplasma mycoides* ssp *mycoides*; *Peronosclerospora philippinensis*; *Phakopsora pachyrhizi*; *Plesiomonas shigelloides*; *Ralstonia solanacearum* raza 3, biovar 2; *Rickettsia prowazekii*; *Rickettsia rickettsii*; *Salmonella* spp.; *Schlerophthora rayssiae* varzeae; *Shigella* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus*; *Synchytrium endobioticum*; *Vibrio cholera* no 01; *Vibrio cholerae* O1; *Vibrio parahaemolyticus* y otros vibriones; *Vibrio vulnificus*; *Xanthomonas oryzae*; *Xylella fastidiosa* (cepa *clorosis* variegada con *citrus*); *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*; y *Yersinia pestis*.

Ejemplos adicionales de analitos incluyen virus tales como el virus de la peste equina africana; virus de la peste porcina africana; virus Akabane; virus de la gripe aviar (altamente patógeno); virus Bhanja; virus de la lengua azul (exótico); virus de la viruela del camello; virus del herpes de los cercopitecinos 1; virus de Chikungunya; virus de la peste porcina clásica; coronavirus (SARS); virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; virus del dengue; virus Dugbe; virus Ébola; virus de encefalitis tales como el virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis japonesa, encefalitis del Valle Murray y virus de la encefalitis equina venezolana; morbilivirus equino; virus Flexal; virus de la fiebre aftosa; virus Germiston; virus de la viruela caprina, Hantaan u otros virus Hanta; virus Hendra; virus Issyk-Kul; virus Koutango; virus de la fiebre Lassa; virus de la enfermedad de Louping; virus de la dermatosis nodular contagiosa; virus de la coriomeningitis linfocítica; virus de la fiebre catarral maligna (exótico); virus Marburg; virus Mayaro; virus Menangle; virus de la viruela de los monos; virus Mucambo; virus de la enfermedad de Newcastle (ENNV); virus Nipah; grupo de virus Norwalk; virus Oropouche; virus Orungo; virus de la peste de los pequeños rumiantes; virus Piry; virus de la viruela de la ciuella; virus de la polio; virus de la patata; virus de Powassan; virus de la fiebre del Valle del Rift; virus de la peste bovina; rotavirus; virus del bosque de Semliki; virus de la viruela ovina; virus de fiebre hemorrágica sudamericanos tales como Flexal, Guanarito, Junin, Machupo y Sabia; virus Spondweni; virus de la enfermedad vesicular porcina; (flavi) virus complejos de encefalitis transmitida por garrapatas tales como la encefalitis transmitida por la garrapata centroeuropea, encefalitis transmitida por garrapatas del lejano oriente, encefalitis de la primavera y el verano rusos, enfermedad de la selva de Kyasanur y fiebre hemorrágica de Omsk; virus de la viruela mayor (virus de la viruela); virus de la viruela menor (alastrim); virus de la estomatitis vesicular (exótico); virus Wesselbron; virus del Nilo occidental; virus de la fiebre amarilla; virus de la familia Papovaviridae, incluyendo poliomavirus, tales como SV40, JC y BK y entre ellos los virus del papiloma (por ejemplo, VPH); parvovirus (por ejemplo, B19 y RA-1); y virus de la familia Picornaviridae, incluyendo rinovirus y Cocksackie B. Otros virus que pueden comprender una secuencia de ácido nucleico diana incluyen especies no mencionadas anteriormente que pertenecen a la familias *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Arterivirus*, *Astroviridae*, *Baculoviridae*, *Badnavirus*, *Bamaviridae*, *Bimaviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Circoviridae*, *Closterovirus*, *Comoviridae*, *Coronaviridae*, *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Deltavirus*, *Dianthovirus*, *Enamovirus*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Furovirus*, *Fuselloviridae*, *Geminiviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Hordeivirus*, *Hypoviridae*, *Idaeovirus*, *Inoviridae*, *Iridoviridae*, *Leviviridae*, *Lipothrixviridae*, *Luteovirus*, *Machlomovirus*, *Marafivirus*, *Microviridae*, *Myoviridae*, *Necrovirus*, *Nodaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Partitiviridae*, *Parvoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Plasmaviridae*, *Podoviridae*, *Polydnviridae*, *Potexvirus*, *Potyviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Rhizidiovirus*, *Sequiviridae*, *Siphoviridae*, *Sobemovirus*, *Tectiviridae*, *Tenuivirus*, *Tetraviridae*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Togaviridae*, *Tombusviridae*, *Totiviridae*, *Tymovirus* y *Umbravirus*.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen toxinas tales como abrina; aflatoxinas; neurotoxina botulínica; toxinas

de *Ciguatera*; toxina épsilon de *Clostridium perfringens*; conotoxinas; diacetoxiscirpenol; toxina de difteria; grayanotoxina; toxinas de hongos tales como amanitinas, giromitrina y orelanina; fitohemaglutinina; alcaloides de pirrolizidina; ricina; toxinas de marisco (paralíticas, diarreicas, neurotóxicas o amnésicas) tales como saxitoxina, ácido akadaico, toxinas de *Dinophysis*, pectenotoxinas, yesotoxinas, brevetoxinas y ácido domoico; Shigatoxinas; proteínas inactivadoras de ribosomas similares a Shiga; toxinas de serpientes; enterotoxinas estafilocócicas; toxina T-2; y tetrodotoxina.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen proteínas priónicas tales como el agente de la encefalopatía espongiforme bovina.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen protozoos y gusanos parásitos, tales como: *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre; *Anisakis* sp. y otros gusanos relacionadas *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*; *Cryptosporidium parvum*; *Cyclospora cayetanensis*; *Diphyllobothrium* spp.; *Entamoeba histolytica*; *Eustrongylides* spp.; *Giardia lamblia*; *Nanophyetus* spp.; *Shistosoma* spp.; *Toxoplasma gondii*; y *Trichinella*.

Otros ejemplos de analitos incluyen hongos tales como: *Aspergillus* spp. ; *Blastomyces dermatitidis*; *Candida*; *Coccidioides immitis*; *Coccidioides posadasii*; *Cryptococcus neoformans*; *Histoplasma capsulatum*; Óxido de maíz; El tizón del arroz; Arroz enfermedad de la mancha de color marrón; Explosión de centeno; *Sporothrix schenckii*; y hongo del trigo.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen elementos genéticos, ácidos nucleicos recombinantes y organismos recombinantes, tales como

(1) ácidos nucleicos (sintéticos o de origen natural, contiguos o fragmentados, en cromosomas hospedadores o en vectores de expresión) que pueden codificar formas competentes infecciosas y/o de replicación de cualquiera de los agentes seleccionados.

(2) ácidos nucleicos (sintéticos o de origen natural) que codifican la forma o formas funcionales de cualquiera de las toxinas enumerados si los ácidos nucleicos

(i) están en un vector o cromosoma hospedador;

(ii) pueden expresarse in vivo o in vitro; o

(iii) están en un vector o cromosoma hospedador y pueden expresarse in vivo o in vitro;

(3) complejos de ácido nucleico - proteína que son ubicaciones de eventos reguladores celulares:

(i) complejos de ácido nucleico vírico - proteína que son precursores de la replicación vírica;

(ii) complejos de ARN - proteína que modifican la estructura del ARN y regulan eventos de transcripción de proteínas; o

(iii) complejos de ácido nucleico - proteína que se regulan mediante hormonas o moléculas de señalización celular secundaria.

(4) virus, bacterias, hongos y toxinas que se han modificado genéticamente.

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen moléculas de respuesta inmunitaria a los ejemplos de analitos anteriormente mencionados tales como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

La expresión "análogo del analito", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que compite con el analito de interés por la unión a un compañero de unión. Un análogo del analito puede ser una cantidad conocida del analito de interés en sí mismo que se añade para competir por la unión a un compañero de unión específico con el analito de interés presente en una muestra. Los ejemplos de análogos del analito incluyen azidotimidina (AZT), un análogo de un nucleótido que se une a la transcriptasa inversa del VIH, puromicina, un análogo de la parte de aminoacil-adenosina terminal de aminoacil-ARNt y metotrexato, un análogo de tetrahidrofolato. Otros análogos pueden ser derivados del analito de interés. La expresión "análogo marcado del analito", como se usa en el presente documento, se define de una manera análoga al compañero de unión marcado.

Como se usa en el presente documento, el término "soporte" se refiere a cualquiera de las formas para la inmovilización de compañeros de unión que son conocidos en la técnica, tales como membranas, perlas, partículas, electrodos o incluso las paredes o superficies de un recipiente. El soporte puede comprender cualquier material sobre el que el compañero de unión se inmovilice convencionalmente, tal como nitrocelulosa, poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, EVA, vidrio, carbono, carbono vítreo, negro de carbono, nanotubos o fibrillas de carbono, platino, paladio, oro, plata, cloruro de plata, iridio, rodio o aleaciones que comprenden los elementos metálicos en esta lista. En una realización, el soporte es una perla, tal como una perla de poliestireno o una perla magnetizable. Como se usa en el presente documento, la expresión "perla magnetizable" abarca, perlas y/o partículas magnéticas, paramagnéticas y superparamagnéticas. En diversas realizaciones, las perlas pueden tener una serie de diferentes tamaños, por ejemplo, superior a aproximadamente 3 mm, inferior a aproximadamente 3 mm, inferior a aproximadamente 1 mm, inferior a aproximadamente 0,1 mm, inferior a aproximadamente 100 µm, inferior

a aproximadamente 10 µm, inferior a aproximadamente 5 µm, aproximadamente 2,8 µm, aproximadamente 1 µm, inferior a aproximadamente 1 µm, inferior a aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 0,1 µm o inferior a aproximadamente 0,1 µm. El tamaño de la perla puede variar de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 5 µm o de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 3 µm o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 3 µm o de aproximadamente 2,8 µm a aproximadamente 5 µm. También pueden usarse combinaciones de tamaños de perlas. En una realización, el soporte es un tubo de microcentrífuga o al menos un pocillo de una placa de pocillos múltiples.

La expresión "composición seca", como se usa en el presente documento, significa que la composición tiene un contenido de humedad inferior o igual a aproximadamente el 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición. Los ejemplos de composiciones secas incluyen composiciones que tienen un contenido de humedad inferior o igual a aproximadamente el 3 % en peso con respecto al peso total de la composición, inferior o igual a aproximadamente el 1 % en peso con respecto al peso total de la composición y composiciones que tienen un contenido de humedad que varía de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 % en peso, con respecto al peso total de la composición.

En algunas realizaciones de la presente invención, la sustancia de realización del ensayo es una composición seca. En algunas realizaciones de la presente invención, el resto EQL es una composición seca.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, comprende líquidos que puedan contener el analito. El término "líquido", como se usa en el presente documento comprende la adición a la definición más tradicional de coloides líquidos, suspensiones, dispersiones y dispersiones de partículas en un líquido en el que las partículas tienen una velocidad de sedimentación debida a la gravedad de la tierra de menos de aproximadamente 1 mm/s. La muestra puede extraerse de cualquier fuente de la que se desea el análisis. Por ejemplo, la muestra puede surgir del cuerpo u otro fluido biológico, tal como sangre, plasma, suero, leche, semen, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado broncoalveolar, lágrimas, saliva, orina o heces. Como alternativa, la muestra puede ser una muestra de agua obtenida de un cuerpo de agua, tal como un lago o río. La muestra también puede prepararse disolviendo o suspendiendo una muestra en un líquido, tal como agua o un tampón acuoso. La fuente de la muestra puede ser un hisopo de superficie; por ejemplo, puede hisoparse una superficie; el hisopo puede lavarse mediante un líquido; transfiriendo de este modo un analito de la superficie al líquido. La fuente de la muestra puede ser aire; por ejemplo, el aire puede filtrarse; el filtro puede lavarse mediante un líquido; transfiriendo de este modo un analito del aire al líquido.

La expresión "matriz de la muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a todo lo que hay en la muestra con la excepción del analito.

La expresión "fuente de campo magnético", como se usa en el presente documento, incluye imanes y electroimanes permanentes, que son entidades separadas, individuales, con polos magnéticos N-S definidos. Un "imán dipolar" comprende una fuente de campo magnético.

La expresión "imán sándwich", como se usa en el presente documento, se refiere a imanes que comprenden dos o más fuentes de campo magnético configuradas de manera que sus campos magnéticos opuestos se solapan o se compelan. Esto puede conseguirse mediante la colocación de polos opuestos (N-N o S-S) en una proximidad más cercana entre sí que los polos que se atraen (N-S) de las fuentes de campos magnéticos. Por ejemplo, dos imanes dipolares dispuestos en una configuración N-S-S-N o una S-N-N-S formarían un imán sándwich.

La expresión "imán de canal", como se usa en el presente documento, se refiere a una única fuente de campo magnético unida a un material altamente magnetizable en forma de un canal en forma de U. En una configuración de este tipo, el material magnetizable se convierte en una extensión del polo magnético al que está unido.

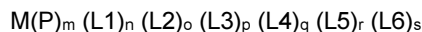
## **B. Restos EQL**

La expresión "resto EQL" se refiere a un resto electroquimioluminiscente, que es cualquier compuesto que pueda inducirse para emitir repetidamente radiación electromagnética mediante la exposición a una fuente de energía eléctrica. Se describen restos EQL representativos en *Electrogenerated Chemiluminescence*, Bard, Editor, Marcel Dekker, (2004); Knight, A y Greenway, G. *Analyst* 119: 879-890, 1994; y en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.221.605; 5.591.581; 5.858.676; y 6.808.939. La preparación de cebadores que comprenden restos EQL es bien conocida en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. 6.174.709. Algunos restos EQL emiten radiación electromagnética en el espectro visible, mientras que otros podrían emitir otros tipos de radiación electromagnética, tales como luz infrarroja o ultravioleta, rayos X, microondas, etc. El uso de los términos "electroquimioluminiscencia", "electroquimioluminiscente", "electroquimioluminiscencia", "luminiscencia", "luminiscente" y "luminiscencia" en conexión con la presente invención no requiere que la emisión sea de luz, sino que incluye la emisión sea de otras formas de radiación electromagnética.

Los restos EQL pueden ser metales de transición. Por ejemplo, el resto EQL puede comprender un compuesto orgánico que contiene metal en el que el metal puede elegirse, por ejemplo, entre rutenio, osmio, renio, iridio, rodio,

platino, paladio, molibdeno y tecnecio. Por ejemplo, el metal puede ser rutenio u osmio. Por ejemplo, el resto EQL puede ser un quelato de rutenio o un quelato de osmio. Por ejemplo, el resto EQL puede comprender bis(2,2'-bipiridil)rutenio (II) y tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser tris bipiridina de rutenio (II) ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ). El metal también puede elegirse, por ejemplo, entre metales de tierras raras, incluyendo pero no limitados a cerio, disprosio, erbio, europio, gadolinio, holmio, lantano, lutecio, neodimio, praseodimio, prometio, terbio, tulio e iterbio. Por ejemplo, el metal puede ser cerio, europio, terbio o iterbio.

Los restos EQL que contienen metal pueden tener la fórmula



en la que M es un metal; P es un ligando polidentado de M; L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son ligandos de M, cada uno de los cuales puede ser igual o diferente entre sí; m es un número entero igual o superior a 1; cada uno de n, o, p, q, r y s es un número entero igual o superior a cero; y P, L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son de una composición y número de manera que el resto EQL pueda inducirse para emitir una radiación electromagnética y el número total de enlaces a M proporcionado por los ligandos de M equivale al número de coordinación de M. Por ejemplo, M puede ser rutenio. Como alternativa, M puede ser osmio.

Algunos ejemplos del resto EQL pueden tener un ligando polidentado de M. El resto EQL también puede tener más de un ligando polidentado. En los ejemplos que comprenden más de un ligando polidentado de M, los ligandos polidentados pueden ser iguales o diferentes. Los ligandos polidentados pueden ser ligandos aromáticos o alifáticos. Los ligandos polidentados aromáticos adecuados pueden ser ligandos heterocíclicos aromáticos y pueden contener nitrógeno, tales como, por ejemplo, bipiridilo, bipirazilo, terpiridilo, 1,10 fenantrolina y porfirinas.

Los ligandos polidentados adecuados pueden estar sin sustituir o sustituidos con cualquiera de un gran número de sustituyentes conocidos en la técnica. Los sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, carboxilato, carboxaldehído, carboxamida, ciano, amino, hidroxilo, imino, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo, amidina, guanidinio, ureido, grupos que contienen maleimida azufre, grupos que contienen fósforo y el éster de carboxilato de N-hidroxisuccinimida.

En algunas realizaciones, al menos uno de L1, L2, L3, L4, L5 y L6 puede ser un ligando heterocíclico aromático polidentado. En diversas realizaciones, al menos uno de estos ligandos heterocíclicos aromáticos polidentados pueden contener nitrógeno. Los ligandos polidentados adecuados pueden ser, pero no se limitan a, bipiridilo, bipirazilo, terpiridilo, 1,10 fenantrolina, una porfirina, bipiridilo sustituido, bipirazilo sustituido, terpiridilo sustituido, 1,10 fenantrolina sustituida o una porfirina sustituida. Estos ligandos polidentados sustituidos pueden estar sustituidos con un alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, carboxilato, carboxaldehído, carboxamida, ciano, amino, hidroxilo, imino, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo, amidina, guanidinio, ureido, maleimida, un grupo que contiene azufre, un grupo que contiene fósforo o el éster de carboxilato de N-hidroxisuccinimida.

Algunos restos EQL pueden contener dos ligandos bidentados, cada uno de los cuales puede ser bipiridilo, bipirazilo, terpiridilo, 1,10 fenantrolina, bipiridilo sustituido, bipirazilo sustituido, terpiridilo sustituido o 1,10 fenantrolina sustituida.

Algunos restos EQL pueden contener tres ligandos bidentados, cada uno de los cuales puede ser bipiridilo, bipirazilo, terpiridilo, 1,10-fenantrolina, bipiridilo sustituido, bipirazilo sustituido, terpiridilo sustituido o 1,10-fenantrolina sustituida. Por ejemplo, el resto EQL puede comprender rutenio, dos ligandos de bipiridilo bidentados y un ligando de bipiridilo bidentado sustituido. Por ejemplo, el resto EQL puede contener un ligando tetradentado tal como una porfirina o porfirina sustituida.

En algunas realizaciones, el resto EQL puede tener uno o más ligandos monodentados, una amplia diversidad de los cuales se conoce en la técnica. Los ligandos monodentados adecuados pueden ser, por ejemplo, monóxido de carbono, cianuros, isocianuros, haluros y fosfinas, aminas, estibinas y arsinas alifáticas, aromáticas y heterocíclicas.

En algunas realizaciones, uno o más de los ligandos de M puede estar unido a marcadores químicos adicionales, tales como, por ejemplo, isótopos radiactivos, componentes fluorescentes o centros que contienen rutenio u osmio luminiscentes adicionales.

Por ejemplo, el resto EQL puede ser tetraquis(pentafluorofenil)borato de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser bis[(4,4'-carbometoxi)-2,2'-bipiridina] 2-[3-(4-metil-2,2'-bipiridina-4-il)propil]-1,3-dioxolano rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser bis(2,2'-bipiridina) [4-(butan-1-yl)-4'-metil-2,2'-bipiridina]rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser bis(2,2'-bipiridina) [ácido 4-(4'-metil-2,2'-bipiridina-4'-il)butírico]rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser (2,2'-bipiridina) [cis-bis(1,2-difenilfosfino)etileno]{2-[3-(4-metil-2,2'-bipiridina-4'-il)propil]-1,3-dioxolano}osmio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser bis(2,2'-bipiridina) [4-(4'-metil-2,2'-bipiridina)-butilamina]rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser bis(2,2'-bipiridina) [1-bromo-4(4'-metil-2,2'-bipiridina-4-il)butano]rutenio (II). Por ejemplo, el resto EQL puede ser ácido bis(2,2'-bipiridina)maleimidoheptanoico, 4-metil-2,2'-

bipiridina-4'-butilamida rutenio (II).

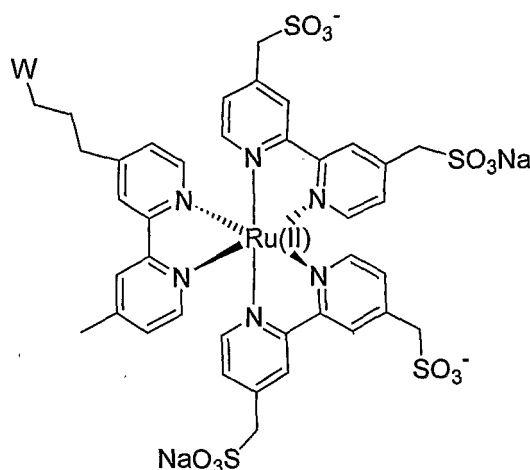
En algunas realizaciones de la presente invención, se usa una sustancia de realización del ensayo, en el que comprende la sustancia de realización del ensayo comprende (i) un resto EQL y (ii) un compañero de unión marcado para un analito o un análogo marcado del analito.

En algunas realizaciones de la presente invención, la sustancia de realización del ensayo comprende un resto EQL.

En algunas realizaciones, el resto EQL comprende un ión metálico seleccionado entre osmio y rutenio.

En algunas realizaciones, el resto EQL comprende un derivado de trisbipiridil rutenio (II)  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ .

En algunas realizaciones, el resto EQL puede ser  $[\text{Ru}(\text{sulfo-bpy})_2\text{bpy}]^{2+}$  cuya estructura es



en la que W es un grupo funcional tal como un éster de NHS, un carboxilo activado, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, una hidrazida, una maleimida o una fosforamida. Este grupo funcional puede reaccionar con un material biológico, reactivo de unión, sustrato enzimático u otro reactivo de ensayo para formar un enlace covalente.

En algunas realizaciones, el resto EQL no comprende un metal. Dichos restos EQL no metálicos pueden ser, pero no se limitan a, rubreno y 9,10-difenilantraceno.

### C. Correactivo de EQL

La expresión "correactivo de EQL", como se usa en el presente documento, pertenece a un compuesto químico que ya sea por sí mismo o a través de su producto o productos de reducción oxidación electroquímica, desempeña una función en la secuencia de reacción de EQL. Por simplicidad, como se usa en el presente documento, se describen correactivos de EQL sin tener en cuenta reacciones de ácido-base; todas las formas de ácido-base de los compuestos indicados también se contemplan y reivindican.

Con frecuencia los correactivos de EQL pueden permitir el uso de medios más simples para generar EQL (por ejemplo, el uso de solo la mitad del ciclo de oxidación-reducción de doble etapa) y/o una intensidad de EQL mejorada. En algunas realizaciones, los correactivos de EQL pueden ser compuestos químicos que, tras la oxidación/reducción electroquímica, producen, directamente o tras una reacción adicional, especies fuertemente oxidantes o reductoras en solución. Un correactivo de EQL puede ser peroxodisulfato (es decir,  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ , persulfato) que se electro-reduce irreversiblemente para formar iones  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  oxidantes. El correactivo de EQL también puede ser oxalato (es decir,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ) que es electro-oxida irreversiblemente para formar iones  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  reductores. Una clase de correactivos de EQL que pueden actuar como agentes reductores son aminas o compuestos que contienen grupos amina, incluyendo, por ejemplo, tri-n-propilamina (es decir,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ , TPA). En algunas realizaciones, las aminas terciarias pueden ser correactivos de EQL mejores que las aminas secundarias. En algunas realizaciones, las aminas secundarias pueden ser correactivos de EQL mejores que las aminas primarias.

En algunas realizaciones, la célula electroquímica de la presente invención comprende adicionalmente un correactivo de EQL.

En algunas realizaciones, el correactivo de EQL comprende una amina terciaria.

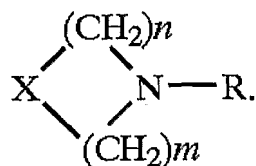
En algunas realizaciones, el correactivo de EQL comprende una amina terciaria que comprende un grupo funcional

hidrófilo.

En algunas realizaciones, el correctivo de EQL es una amina que tiene una estructura  $NR^1R^2R^3$ , en la que  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son grupos alifáticos  $C_{1-10}$  en los que al menos uno de los grupos alifáticos  $C_{1-10}$  está sustituido con al menos un grupo funcional hidrófilo. En algunas realizaciones, el grupo funcional hidrófilo es un grupo cargado, por ejemplo, un grupo cargado negativamente. Los grupos funcionales hidrófilos pueden ser hidroxilo, hidroxycarbonilo, amino, aminocarbonilo, amidina, imino, ciano, nitro, nitrato, sulfato, sulfonato, fosfato, fosfonato, silicato, carboxilato, borato ( $B(OH)_3$ ), guanidinio, carbamida, carbamato, carbonato, sulfamida, sililo, siloxi y amida.

En algunas realizaciones, el correctivo de EQL tiene la estructura  $(n\text{-propil})_2\text{N}(\text{CH}_2)_{n1}\text{R}^*$ : en la que  $n1$  es un número entero de 1 a 10; y  $\text{R}^*$  es un grupo funcional hidrófilo, como se ha definido anteriormente. En algunas realizaciones,  $n1$  es 2. En algunas realizaciones,  $n1$  es 3. En algunas realizaciones,  $n1$  es 4.

En algunas realizaciones, el correctivo de EQL tiene la fórmula



en la que X se selecciona entre  $-(CH_2)-$ ,  $-(CHR^{11})-$ ,  $-(CR^{11}R^{12})-$ , un heteroátomo y  $-N(R^{11})-$ ; R es un grupo alifático  $C_{1-10}$  sustituido con al menos un grupo funcional hidrófilo; cada uno de  $R^{11}$  y  $R^{12}$  es independientemente un grupo alifático  $C_{1-10}$  opcionalmente sustituido con al menos un grupo funcional hidrófilo; y  $n$  y  $m$  son independientemente números enteros de 1 a 10.

En algunas realizaciones, el heteroátomo puede ser, por ejemplo, -O- o -S-.

En algunas realizaciones,  $n$  es 2. En algunas realizaciones,  $n$  es 3. En algunas realizaciones,  $n$  es 4. En algunas realizaciones,  $m$  es 2. En algunas realizaciones,  $m$  es 3. En algunas realizaciones,  $m$  es 4.

En algunas realizaciones, R<sup>11</sup> es un grupo alifático C<sub>1-4</sub>.

En algunas realizaciones, R es un grupo alifáticos C<sub>1-4</sub> sustituido con al menos un grupo funcional hidrófilo.

Quando X es  $-N(R^{11})-$ ,  $R^{11}$  puede ser, por ejemplo,  $-(CH_2)_{n3}-R^{13}$ , en el que  $n3$  es un número entero de 3 a 20, o, por ejemplo, de 3 a 10 y  $R^{13}$  es H, un grupo alifático o un grupo funcional hidrófilo. En algunas realizaciones  $n3$  es 3. En algunas realizaciones  $n3$  es 4.

En algunas realizaciones, R es  $-(CH_2)_{n2}-R^{12}$ , en el que  $n2$  es un número entero de 3 a 20, por ejemplo de 3 a 10.

En algunas realizaciones  $n_2$  es 3. En algunas realizaciones  $n_2$  es 4. En algunas realizaciones  $n_2$  es de 5.

En algunas realizaciones,  $R^{12}$  es un grupo funcional hidrófilo. En algunas realizaciones,  $R^{12}$  es un carboxilato o sulfonato.

El uso de correctivos de EQL que tienen grupos funcionales hidrófilos (y, en particular, correctivos de EQL que son zwitteriónicos a pH neutro) tiene diversas ventajas que no están relacionadas con su capacidad para actuar como correctivos de EQL. Estas especies tienden a ser altamente hidrosolubles y tienen una presión de vapor baja. Por estas razones, es posible producir soluciones madre muy concentradas que pueden diluirse según sea necesario para su uso. También es posible preparar reactivos secados que comprendan los correctivos de EQL sin incertidumbre debido a la pérdida de correctivo de EQL en la fase de vapor. Además, cuando están presentes en una composición seca, estos correctivos de EQL se vuelven a solubilizar rápidamente en un mínimo de volumen.

Los correctivos de EQL incluyen, pero no se limitan a, lincomicina; clindamicina-2-fosfato; eritromicina; 1-metilpirrolidona; difenidol; atropina; trazodona; hidroflumetiazida; hidroclorotiazida; clindamicina; tetraciclina; estreptomicina; gentamicina; reserpina; trimetilamina; tri-n-butilfosfina; piperidina; N,N-dimetilanilina; feniramina; bromofeniramina; clorofeniramina; difenilhidramina; 2-dimetilaminopiridina; pirilamina; 2-bencilaminopiridina; leucina; valina; ácido glutámico; fenilalanina; alanina; arginina; histidina; cisteína; triptófano; tirosina; hidroxiprolina; asparragina; metionina; treonina; serina; ciclotiazida; triclormetiazida; 1,3-diaminopropano; piperazina; clorotiazida; ácido barbitúrico; persulfato; penicilina; 1-piperidinol etanol; 1,4-diaminobutano; 1,5-diaminopentano; 1,6-diaminohexano; etilendiamina; bencenosulfonamida; tetrametilsulfona; etilamina; n-hexilamina; sulfato de hidrazina; glucosa; n-metilacetamida; ácido fosfonoacético; y/o sales de los mismos.

Los correactivos de EQL incluyen, pero no se limitan a, 1-etilpiperidina; 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2"-nitritotrietanol (BIS-TRIS); 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano (bis-Tris propano) (BIS-TRIS propano); ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES); ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO); 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) (HEPPSO); ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico (EPPS); ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico (MOBS); N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (BICINE); DAB-AM-16, dendrímero de polipropilenimina hexadecaamina (DAB-AM-16); DAB-AM-32, dendrímero de polipropilenimina dotriacontaamina (DAB-AM-32); DAB-AM-4, dendrímero de polipropilenimina tetraamina (DAB-AM-4); DAB-AM64, dendrímero de polipropilenimina tetrahexacontaamina; DABAM-8, dendrímero de polipropilenimina octaamina (DABAM-8); di-etilamina; dinucleótido de dihidronicotinamida adenina (NADH); di-iso-butilamina; di-iso-propilamina; di-n-butilamina; di-n-pentilamina; di-n-propilamina; di-n-propilamina; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); glicil-glicina (Gly-Gly); ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA); N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES); N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 4-butanosulfónico) (HEPBS); ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico (DIPSO); N,N-bis(2-hidroxietil)taurina (BES); N-etilmorfolina; ácido oxálico; piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxiopropanosulfónico) (POPSO); s-butilamina; esparteína; t-butilamina; trietanolamina; tri-etilamina; tri-iso-butilamina; tri-iso-propilamina; tri-n-butilamina; tri-n-butilamina; tri-n-pentilamina; N,N,N',N'-tetrapropil-1,3-diaminopropano; oxalato; peroxodisulfato; piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES); tri-n-propilamina; 3-dimetilamino-1-propanol; 3-dimetilamino-2-propanol; 1,3-bis(dimetilamino)-2-propanol; 1,3-bis(diethylamino)-2-propanol; 1,3-bis(dipropilamino)-2-propanol; ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfónico (TES); ácido piperazina-N,N'-bis-3-propanosulfónico (PIPPS); ácido piperazina-N,N'-bis-4-butanosulfónico (PIPBS); ácido 1,6-diaminohexano-N,N,N',N'-tetraacético; ácido 4-(di-n-propilamino)-butanosulfónico; ácido 4-[bis-(2-hidroxietano)-amino]-butanosulfónico; azepan-N-(ácido 3-propanosulfónico); ácido N,N-bis propil-N-4-aminobutanosulfónico; piperazina-N,N'-bis-3-metilpropanoato; piperazina-N-2-hidroxietano-N'-3-metilpropanoato; piperidina-N-(ácido 3-propanosulfónico); piperidina-N-(ácido 3-propiónico) (PPA); ácido 3-(di-n-propilamino)-propanosulfónico; y/o sales de los mismos.

En algunas realizaciones, el correactivo de EQL se selecciona entre piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), tri-n-propilamina, N,N,N',N'-tetrapropilo-1,3-diaminopropano, 1,3-bis(dipropilamino)-2-propanol y sales y mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el correactivo de EQL se selecciona entre oxalato o tri-n-propilamina.

#### **D. Células y electrodos electroquímicos**

El término "semicélula" se refiere a un medio de una célula electrolítica o voltaica, donde se produce ya sea oxidación o reducción.

La expresión "reacción de semicélula" se refiere a la reacción que se produce cuando los electrones se intercambian entre un electrodo en la semicélula y el electrolito. En el ánodo la reacción de semicélula es la oxidación, mientras que la reacción de semicélula en el cátodo es la reducción.

La expresión "producto de semicélula" se refiere a los productos formados a partir de una reacción de semicélula.

La expresión "electrodo de trabajo" se refiere al electrodo de ensayo o de muestra de ensayo en una célula electroquímica donde tiene lugar una reacción de semicélula. En el presente ejemplo, el electrodo de trabajo es también un electrodo faradaico.

El término "contraelectrodo" se refiere a un electrodo en una célula electroquímica a la que fluye la carga, carga que es necesariamente de un signo opuesto al de carga que fluye al electrodo de trabajo. En algunas realizaciones el contraelectrodo es también un electrodo capacitivo.

La expresión "electrodo de referencia" se refiere a un electrodo no polarizable con un potencial conocido y altamente reproducible utilizado para análisis potenciométricos y voltamétricos. El electrodo de referencia proporciona un punto de referencia estable, contra el cual se mide la tensión de un electrodo de trabajo. Son electrodos de referencia normales el electrodo de plata/cloruro de plata y el electrodo de calomelanos. Se consigue una alta estabilidad del potencial del electrodo de referencia mediante el empleo de un sistema de oxidación-reducción donde todos los participantes (por lo general dos, un oxidante y un reductor) de la reacción están presentes en altas concentraciones. Durante el uso no se hace pasar ninguna corriente significativa con el fin de alterar la concentración de oxidante o reductor. Un electrodo de referencia (ER) difiere de un electrodo faradaico.

La expresión "electrodo faradaico" se refiere a un electrodo que generalmente obedece la ley de Faraday mientras que se usa en una célula electroquímica. Los electrodos de Faraday excluyen electrodos de referencia. Un electrodo faradaico permite que pase una corriente significativa lo que puede alterar la concentración de todos o algunos de los participantes de oxidación-reducción. Por ejemplo, un electrodo faradaico puede operar en un sistema en el que solo el oxidante está presente inicialmente de manera que forme un reductor. Por ejemplo, un electrodo faradaico puede operar sobre un sistema donde solo el agente reductor está presente inicialmente de manera que se forme un oxidante.

Los electrodos faradaicos pueden fabricarse a partir de metales y semiconductores, tales como electrodos de lámina de platino, electrodos de alambre de platino, electrodos de aleación de platino (incluyendo elementos de aleación de Ni, Pd, Au, Co, Fe, Ru, Os, Cr, Mo, Zr, Nb, Ir, Rh y W), electrodos de iridio, electrodos de aleación de iridio (incluyendo elementos de aleación de Ni, Pd, Co, Fe, Ru, Os, Cr, Mo, Zr, Nb, Pt, Rh y W), electrodos de rodio, electrodos de aleación de rodio (incluyendo elementos de aleación de Au, Ni, Pd, Co, Fe, Ru, Os, Cr, Mo, Zr, Nb, Ir, Pt y W), electrodos de carbono vítreo, electrodos de grafito, electrodos de carbono, electrodos de tinta de carbono, electrodos de oro, electrodos de plata, electrodos de aleación de plata, electrodos de níquel, electrodos de aleación de níquel, electrodos de trabajo de acero inoxidable y similares. Véase, por ejemplo, Bard y Faulkner; Wiley, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications: 2 ed* (2000).

En algunas realizaciones de la presente invención, el electrodo de trabajo faradaico comprende carbono, oro, aleaciones de oro, platino, aleaciones de platino, iridio, aleaciones de iridio, plata, aleaciones de plata, níquel, aleaciones de níquel, acero inoxidable o mercurio.

En algunas realizaciones, el electrodo de trabajo faradaico es un ultramicroelectrodo.

La expresión "electrodo capacitivo" se refiere a un electrodo que tiene una transferencia de electrones limitada a la solución de electrolitos. El electrodo capacitivo se caracteriza por una capacidad de acumular o atrapar carga dentro del electrodo. La carga atrapada dentro del electrodo se estabiliza por la acumulación o recogida de especies iónicas (una denominada capa doble) en el electrolito en la interfase electrodo de superficie/electrolito. Puede considerarse que un electrodo es un electrodo capacitivo incluso si algo de corriente galvánica es medible.

Un método para caracterizar un electrodo capacitivo es a través de la cantidad de corriente galvánica por unidad de área que puede pasar a través del electrodo. Esta corriente se denomina a veces una "densidad de corriente de fuga". En aras de claridad, la corriente de fuga se mide usando el siguiente método. 1. Usar una célula que contiene (a) el electrodo de ensayo con un área geométrica de  $0,1 \text{ cm}^2$ , (b) un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata cuya área electroquímica es al menos 10 veces el área del electrodo de ensayo y en el que la separación entre los electrodos inferior a la dimensión más grande del electrodo de referencia y (c) un electrolito de soporte inerte: KCl 3 M acuoso, pH 6 a 8 (ajustado con HCl o KOH). Aplicar voltaje que pasa del potencial de reposo (el potencial en el que no fluye ninguna corriente) al potencial de reposo más  $0,32 \text{ V}$ . Medir la corriente en función del tiempo. La constante de tiempo del experimento 1 es el valor absoluto de la relación de la corriente y la pendiente en el momento en el que la pendiente de la disminución de la corriente es mayor. 2. Usar la misma célula de la etapa 1, añadir ferricianuro y ferrocianuro de manera que la concentración final de cada uno sea  $1 \text{ mM}$ , proporcionar agitación suficiente de la solución de manera que la célula agitada tenga un coeficiente de transferencia de masa de  $10^{-2} \text{ cm/s}$ , usar un volumen total de la solución de manera que el volumen sea superior a o igual al área de electrodo de ensayo multiplicada por el coeficiente de transferencia de masa multiplicado por la constante de tiempo del experimento 1 multiplicado por 100, después, aplicar la misma forma de onda de tensión que en la etapa 1. La "corriente de fuga" se define como la corriente medida en esta segunda etapa después de 25 constantes de tiempo de experimento 1. La densidad de corriente de fuga es la que se define como la corriente de fuga dividida por el área del electrodo de ensayo.

En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $100 \text{ nA}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $10 \text{ nA}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $1 \text{ nA}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es inferior a  $100 \text{ pA}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya densidad de corriente de fuga es de aproximadamente  $100 \text{ pA}/\text{cm}^2$  a aproximadamente  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya corriente de fuga densidad es de aproximadamente  $1 \text{ nA}/\text{cm}^2$  a aproximadamente  $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Un método para caracterizar un electrodo capacitivo es a través de la constante de tiempo del electrodo. La constante de tiempo se define como el producto de la resistencia del electrodo y la capacitancia del electrodo. El siguiente aparato se usa para medir estas cantidades (que tiene por objeto minimizar la impedancia de la solución y un electrodo no de ensayo con el fin de determinar mejor las propiedades de un electrodo de ensayo): (1) una célula que contiene el electrodo de ensayo y un electrodo de Ag/AgCl cuya área electroquímica es al menos 10 veces el área del electrodo de ensayo en el que la separación entre los electrodos es inferior a la dimensión más grande del electrodo de referencia; (2) una solución acuosa en la célula que consiste esencialmente en  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $760 \mu\text{M}$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $760 \mu\text{M}$  y KCl  $1 \text{ M}$ , pH 6 - 8 (ajustado con KOH y/o HCl); y (3) un generador de tensión que aplica una tensión de polarización DC igual al potencial de reposo (el potencial al que la corriente es 0) más un pico sinusoidal de  $59 \text{ mV}$  y un medidor de corriente. Se usa una técnica de barrido sinusoidal para medir la dependencia de la frecuencia de la impedancia compleja (tensión aplicada dividida por la corriente medida).  $z_1$  es igual al valor asintótico de la magnitud de la impedancia compleja a medida que la frecuencia se aproxima a 0.  $z_2$  es igual al valor asintótico de la magnitud de la impedancia compleja en el límite de alta frecuencia.  $\omega_{\min}$  es igual a la frecuencia en radianes a la que el ángulo de fase de la impedancia compleja es la más negativa. La resistencia del electrodo es

$$\frac{\sqrt{z_1/z_2}}{(z_1 - z_2)\omega_{\min}}$$

igual a  $z_1 - z_2$ . La capacitancia del electrodo es igual a  $\frac{\sqrt{z_1/z_2}}{(z_1 - z_2)\omega_{\min}}$ . En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es superior o igual a 1 segundo. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es superior o igual a 10 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es superior o igual a 100 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es superior o igual a 1.000 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es superior o igual a 10.000 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es de 1 segundo a 100.000 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es de 5 segundos a 10.000 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es de 10 segundos a 1.000 segundos. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 100 segundos.

Un método para caracterizar un electrodo capacitivo es mediante la relación de las constantes de tiempo del electrodo capacitivo y el electrodo de trabajo. Esta relación se relaciona con la relación de la cantidad de producto electroquímico generado en los dos electrodos. Normalmente, a menudo que la constante de tiempo del electrodo capacitivo aumenta con respecto al electrodo de trabajo, la cantidad de producto electroquímico generada en el electrodo capacitivo con respecto al electrodo de trabajo disminuye. En esta definición, un electrodo capacitivo no puede definirse de manera aislada; más bien, se define con respecto a un electrodo de trabajo particular. Para calcular la relación de las constantes de tiempo del electrodo capacitivo y el electrodo de trabajo, cada constante de tiempo se mide individualmente usando el método descrito en el párrafo anterior. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es 10 veces superior a la constante de tiempo del electrodo de trabajo. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es 100 veces superior a la constante de tiempo del electrodo de trabajo. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es 1.000 veces superior a la constante de tiempo del electrodo de trabajo. En algunas realizaciones, un electrodo capacitivo es uno cuya constante de tiempo es 10.000 veces superior a la constante de tiempo del electrodo de trabajo.

En algunas realizaciones, el contraelectrodo capacitivo es un electrodo polarizado idealmente.

En algunas realizaciones, el contraelectrodo capacitivo comprende un material semiconductor con una capa de óxido.

En algunas realizaciones, el contraelectrodo capacitivo comprende un material conductor con una capa de óxido.

En algunas realizaciones, el contraelectrodo capacitivo comprende un material cuya resistividad masiva es inferior a  $10^{-2} \Omega\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cubierto por un material eléctricamente aislante que tiene una resistividad masiva superior a  $10^4 \Omega\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$  en el que el material aislante tiene un espesor medio que es inferior a aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones, el material aislante tiene una resistividad masiva superior a  $10^5 \Omega\text{m}$  a aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  y el material aislante tiene un espesor medio que es inferior a  $100 \text{ nm}$ .

En algunas realizaciones, el contraelectrodo capacitivo comprende óxidos de silicio, titanio, aluminio, magnesio, circonio y/o tantalio.

El término "electrólito" se refiere a un medio que proporciona el mecanismo de transporte de iones entre los electrodos de una célula electroquímica. Generalmente los electrolitos son sustancias que se disocian en iones cuando están en solución y son capaces de conducir la electricidad, tales como ácidos, bases y sales.

El término "capacitancia" se refiere a la propiedad que permite el almacenamiento de cargas separadas eléctricamente cuando existen diferencias de potencial entre los conductores. La capacitancia de un condensador de dos terminales se define como la relación entre la carga eléctrica conectada óhmicamente a un terminal y la diferencia resultante en el potencial entre los terminales. En la presente invención el electrodo capacitivo actúa como un capacitor cuando almacena carga dentro del electrodo y recoge contracargas en la interfase electrodo - electrolito.

El término "permitividad" es igual a la densidad de flujo eléctrico (D) dividida por la intensidad de campo eléctrico (E). La permitividad de un material puede cambiar con frecuencia. En las presentes aplicaciones electroquímicas, el intervalo de frecuencias relativas es bajo, superando el extremo superior rara vez las decenas de kHz. La capacitancia de un capacitor de placas paralelas es aproximadamente igual a la permitividad del material entre las placas multiplicada por el área de una de las placas dividida por la distancia entre las placas.

Los "métodos culombimétricos" son conocidos en la técnica y pueden usarse para añadir cuantitativamente electrones o para retirar electrones de un sistema. Los métodos culombimétricos implican la generación

electroquímica de especies químicas en una solución a través de una reacción del electrodo. La cantidad de producto ( $N_o$ ) generada en el electrodo de trabajo faradaico puede controlarse por la carga pasada en ese electrodo, que se rige por la ley de Faraday:

$$N_o = q/(n F)$$

donde  $q$  es la carga que pasa a través del electrodo,  $n$  es el número de electrones utilizado para generar 1 molécula de producto en el electrodo de trabajo y  $F$  es la constante de Faraday. Cuando se usan métodos coulombimétricos, debe tenerse cuidado para representar la capacitancia del electrodo.

Los electrodos capacitivos pueden fabricarse a partir de metales y semiconductores oxidados. Los ejemplos adicionales de electrodos capacitivos incluyen electrodos fabricados a partir de materiales que tienen una resistividad masiva inferior a  $10^{-2} \Omega/\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cubiertos por un material aislante delgado (espesor medio inferior a  $10 \mu\text{m}$ ), incluyendo dieléctricos para la fabricación de circuitos integrados, tales como dióxido de silicio, nitruro de silicio, TiN, TaN, TiAlN, TaAlN, Tasin,  $\text{SrTiO}_3$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{BaSrTiO}_3$ , FOX®-1x y FOX®-2x (Dow Corning, Midland, MI) familias de productos de óxido fluible (que comprende silsesquioxano de hidrógeno); máscaras de soldadura (como se describe en la norma IPC-SM-840C: Cualificación y rendimiento de una máscara de soldadura permanente); y revestimientos conformacionales (tales como se describen en la norma IPC SM - 840 Clasificación y rendimiento de la máscara de soldadura permanente) tales como parileno y Novec™ EGC-1700, EGC-1702, EGC-1704 y recubrimientos electrónicos EGC-1720 (3M, MN).

Los ejemplos adicionales de electrodos capacitivos incluyen electrodos fabricados a partir de materiales que tienen una resistividad masiva inferior a  $10^{-2} \Omega/\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cubiertos por un material aislante delgado (espesor medio inferior a  $1 \mu\text{m}$ ), tal como óxidos de silicio, titanio, aluminio, magnesio, circonio, y/o tantalio.

Los ejemplos adicionales de electrodos capacitivos incluyen electrodos fabricados a partir de materiales que tienen una resistividad masiva inferior a  $10^{-2} \Omega/\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cubierto por un material aislante delgado (espesor medio inferior a  $1 \mu\text{m}$ ) depositado por deposición de vapor químico o por recubrimiento por rotación.

Los ejemplos adicionales de electrodos capacitivos incluyen electrodos fabricados a partir de materiales que tienen una resistividad masiva inferior a  $10^{-2} \Omega/\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ , cubiertos por un material aislante delgado (espesor medio inferior a  $1 \mu\text{m}$ ) de material aislante que tiene una resistividad masiva superior a  $10^4 \Omega/\text{m}$  a  $20^\circ\text{C}$ . Las capas aislantes más delgadas pueden ofrecer una mayor capacitancia para un área de electrodo dado; sin embargo, las capas aislantes más delgadas pueden provocar un aumento de las corrientes de fuga a través de la presencia de agujeros de alfiler en el aislamiento o por ruptura dieléctrica. En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es inferior a  $10 \mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es inferior a  $1 \mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es inferior a  $100 \text{ nm}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es inferior a  $10 \text{ nm}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es inferior a  $1 \text{ nm}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es de  $1 \text{ nm}$  a  $10 \mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es de  $10 \text{ nm}$  a  $1 \mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el espesor medio de la capa aislante sobre el electrodo capacitivo es de  $10 \text{ nm}$  a  $100 \text{ nm}$ .

La capacitancia de un electrodo capacitivo aumenta con la permitividad de la capa aislante. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es aproximadamente igual a la permitividad del espacio libre. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es superior a 1 vez e inferior a 3 veces la permitividad del espacio libre. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es superior a 3 veces e inferior a 5 veces la permitividad del espacio libre. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es superior a 5 veces e inferior a 10 veces la permitividad del espacio libre. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es superior a 10 veces e inferior a 100 veces la permitividad del espacio libre. En algunas realizaciones, la capa aislante tiene una permitividad que es superior a 100 veces la permitividad del espacio libre.

## II. Ciertas realizaciones de la célula y los electrodos

La presente invención se refiere a métodos y aparatos que utilizan una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo. El contraelectrodo capacitivo puede caracterizarse por, por ejemplo, su densidad de corriente de fuga, su constante de tiempo y la relación de su constante de tiempo con respecto a la constante de tiempo del electrodo de trabajo o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones el aparato electroquímico se hace funcionar de una manera que permita una corriente faradaica constante en el electrodo de trabajo produciendo al mismo tiempo poco o ningún de oxidación o de reducción en el contraelectrodo. En algunas realizaciones el aparato electroquímico se hace funcionar de una manera que permita una corriente faradaica constante en el electrodo de trabajo reduciendo al mismo tiempo la cantidad de productos de oxidación o reducción en el contraelectrodo.

Las células electroquímicas normales emplean electrodos faradaicos tanto en el ánodo (donde se producen oxidaciones) como en el cátodo (donde se producen reducciones). Se produce una semirreacción separada en cada uno de estos electrodos, produciendo un producto diferente (producto de semicélula) en cada uno de los electrodos. La solución en su conjunto mantiene la neutralidad de la carga (iónica) en todo momento porque se generan cargas iguales de especies aniónicas y catiónicas por cada una de las reacciones de semicélula en los electrodos correspondientes. Generalmente solamente es de interés la reacción o producto en el electrodo de trabajo. De hecho, el contraelectrodo con frecuencia se coloca en un compartimento diferente, separado por un "separador de células" iónicamente conductor para evitar la mezcla de los productos de semicélula formados en cada uno de los electrodos. Se conocen en la técnica fuentes de sal y otros separadores de células iónicamente conductores. Véase, por ejemplo, Bard y Faulkner; Wiley, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications: 2 ed* (2000).

La presente invención puede usarse en muchos tamaños de células electroquímicas que comprenden un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo. Los intervalos de tamaño de ejemplo para el electrodo de trabajo faradaico incluyen áreas geométricas macroscópicas de  $0,1 \mu\text{m}^2$  a  $10 \text{ m}^2$ , de aproximadamente  $10 \mu\text{m}^2$  a aproximadamente  $10000 \text{ cm}^2$ , de aproximadamente  $10 \text{ mm}^2$  a aproximadamente  $100 \text{ cm}^2$ , de aproximadamente  $10000 \mu\text{m}^2$  a aproximadamente  $10 \text{ cm}^2$ , de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  a aproximadamente  $100 \text{ mm}^2$  y de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  a aproximadamente  $10 \text{ mm}^2$ . Los tamaños de ejemplo para el electrodo de trabajo faradaico incluyen áreas geométricas macroscópicas de aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}^2$ ,  $1 \mu\text{m}^2$ ,  $10 \mu\text{m}^2$ ,  $100 \mu\text{m}^2$ ,  $1000 \mu\text{m}^2$ ,  $10000 \mu\text{m}^2$ ,  $1 \text{ mm}^2$ ,  $10 \text{ mm}^2$ ,  $100 \text{ mm}^2$ ,  $1 \text{ cm}^2$ ,  $10 \text{ cm}^2$ ,  $100 \text{ cm}^2$ ,  $1000 \text{ cm}^2$ ,  $10000 \text{ cm}^2$ ,  $1 \text{ m}^2$ , o  $10 \text{ m}^2$ . Los tamaños e intervalos de tamaño de ejemplo para el contra electrodo capacitivo incluyen aquellos tamaños para el electrodo de trabajo faradaico más tamaños más grandes para adaptar dichas realizaciones como electrodo 202.

En algunas realizaciones, la célula electroquímica puede encerrar parcialmente un volumen de muestra. Por ejemplo, la célula puede ser un pocillo en una placa de ensayo de pocillos múltiples, un vaso de precipitados, un tubo, una célula de flujo u otras formas y tamaños. En algunas realizaciones, el contraelectrodo faradaico y el capacitivo pueden estar en una sola célula, por ejemplo, una célula 200. En algunas realizaciones, el contraelectrodo y el electrodo de trabajo pueden estar en células individuales conectadas conductivamente entre sí por un puente de sal, frita u otros medios de puente, que son bien conocidos en la técnica. La célula también puede configurarse de manera que solo uno de entre el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo se coloque dentro de la célula y el otro se coloque adyacente a la célula, pero en contacto con el fluido dentro de la célula. Además, la célula puede ser una de una pluralidad de células individuales o divididas, por ejemplo, los pocillos de una placa de pocillos múltiples o los tubos múltiples en un sistema de automuestreo.

La célula electroquímica también puede ser una célula de flujo. La célula de flujo puede configurarse con una entrada y una salida de manera que los fluidos puedan fluir a través de la entrada en la célula y después puedan fluir fuera de la célula a través de la salida. Se desvelan células de flujo de electroquimioluminiscencia de ejemplo y métodos para su uso en la Pat. de los EE.UU. N.º 6.200.531.

En algunas realizaciones, la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica. Esta solución puede participar en reacciones electroquímicas en el electrodo de trabajo faradaico cuando es contactado por el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo en la célula electroquímica y la energía eléctrica se aplica entre los electrodos.

En algunas realizaciones, la célula electroquímica puede comprender adicionalmente un electrodo de referencia. En algunas realizaciones, la célula no comprende un electrodo de referencia. El electrodo de referencia, cuando está presente, puede usarse para controlar mejor la caída de potencial a través del electrodo de trabajo faradaico con independencia de la caída de potencial a través del contraelectrodo capacitivo hasta que se alcanza el límite de conformidad de la tensión del potencióstato o se produce una ruptura dieléctrica en el contraelectrodo capacitivo.

### III. Ciertas realizaciones del aparato

En algunas realizaciones, el aparato puede comprender una sustancia de realización del ensayo que comprende al menos uno de (a) un compañero de unión marcado para un analito y (b) un análogo marcado del analito. En algunas realizaciones, la sustancia de realización del ensayo puede ser una composición seca. En algunas realizaciones, la sustancia de realización del ensayo comprende un resto EQL. En estas realizaciones, el aparato puede comprender opcionalmente un correactivo de EQL.

En algunas realizaciones, el aparato comprende adicionalmente una barrera de vapor que engloba la sustancia de realización del ensayo, por ejemplo, para evitar la evaporación de una composición líquida o para prevenir fusión posterior de una composición seca.

En algunas realizaciones, el aparato puede comprender un filtro en conexión fluida con el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo. La filtración es un método para retirar componentes que interfieren de la matriz de la muestra. Los componentes que interfieren pueden retirarse de la matriz de la muestra antes de que la muestra entre en la célula electroquímica. En este enfoque, la barrera del filtro puede retener componentes en forma de partículas que podrían interferir con el proceso de detección. Los componentes en forma de partículas de la

matriz pueden, por ejemplo, interferir con algunas de las metodologías de detección que requieren la captura o la deposición de perlas sobre una superficie de detección. Adicionalmente, la retirada de componentes que interfieren puede disminuir la cantidad de superficie que está disponible para unirse al analito. En algunas realizaciones, los componentes en forma de partículas atrapados en el filtro pueden tratarse para liberar el analito para el proceso de detección.

La filtración separa principalmente componentes de soluciones mediante la presentación de una barrera física que puede excluir partículas más grandes que un tamaño dado. Existen muchos métodos diferentes en la técnica de la filtración para fabricar barreras de estos tipos, siendo cada método una función del material base que se manipula. Por ejemplo, habitualmente se usa alambre de metal para fabricar tamices tejidos que pueden usarse para atrapar partículas extremadamente grandes, por ejemplos, partículas superiores a 50 micrómetros de tamaño. Para capturar partículas en el aire más pequeñas, pueden usarse tamices de alambre de metal de menor diámetro, pero tienen limitaciones debido a la impedancia al flujo de aire (caída de presión). Normalmente se usan membranas a base de polímeros para retirar las partículas más pequeñas de las soluciones. Por ejemplo, el nylon polimérico puede usarse en un proceso de moldeo de inversión de fase para fabricar membranas que varían de aproximadamente una clasificación de tamaño de poro de 10 micrómetros, hasta aproximadamente una clasificación de tamaño de poro de 0,1 micrómetros. Pueden fabricarse membranas a base de polímeros (por ejemplo, polietersulfona, nitrocelulosa o acetato de celulosa) mediante un proceso de moldeo por evaporación del disolvente. El medio de filtración generalmente se incorpora en un dispositivo de sujeción que permite que el fluido de interés pase a través de la barrera de filtro de una manera controlada. En algunas realizaciones, la invención puede usar un medio de filtración que contiene el filtro usando la polietersulfona (PES) polimérica. En ciertas realizaciones, el filtro de PES puede estar encerrado en una carcasa de plástico que puede estar (a) unida a una jeringa, (b) que puede ser parte de desechable de un solo uso diseñado para facilitar la automatización robótica o (c) que puede ser parte de un desechable de usos múltiples diseñado para filtrar una pluralidad de muestras.

La filtración separa principalmente componentes de las soluciones por tamaño. En la mayoría de los filtros, la vía a través del filtro no es un agujero recto, sino más bien un camino retorcido. Esto hace que describir el tamaño del agujero del filtro sea algo operativo en su naturaleza y da lugar a la expresión "clasificación de tamaño de poro". En la determinación de la clasificación de tamaño de poro de un filtro, los filtros se expusieron a un volumen conocido (o cantidad) de partículas de un tamaño conocido (conocido por un medio secundario como la microscopía, la dispersión de la luz o las mediciones de impedancia). Después, la cantidad de partículas corriente abajo del filtro se mide y se compara con la cantidad de partículas aguas arriba del filtro, a través de múltiples tamaños de partículas. Cuando la relación de las partículas corriente abajo frente a corriente arriba cae significativamente por debajo de la unidad para un intervalo dado de tamaños de partículas, se dice que el filtro tiene una capacidad de retirada de ese intervalo de tamaño. Estas relaciones se describen normalmente en unidades de retirada en base logarítmica. Por ejemplo, un filtro clasificado como de 5 micrómetros normalmente reduce el nivel de partículas corriente abajo superiores a 5 micrómetros en una relación de 0,90 (retirada del 90 % o retirada 1 log) a una relación de 0,999 (retirada del 99,9 %: o retirada 3 log). El tamaño de poro del filtro puede elegirse basándose en muchos factores. En algunas realizaciones, el tamaño de poro puede ser lo suficientemente grande para que pase el analito, por ejemplo, esporas de ántrax, que tienen aproximadamente de 1 µm de tamaño. En ciertas realizaciones, el tamaño de poro puede ser lo suficientemente pequeño como para bloquear componentes de bloqueo de la matriz de muestra. El tamaño de poro también puede afectar a la tasa de flujo fluido a través del filtro, creando los poros más pequeños, generalmente, resistencias al flujo más grandes.

En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro de 5 micrómetros. En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 15, 20, 50 o 100 micrómetros. En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro inferior o igual a aproximadamente 100 micrómetros y superior o igual a aproximadamente 10 micrómetros. En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro inferior o igual a aproximadamente 10 micrómetros y superior o igual a aproximadamente 1 micrómetro. En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro inferior o igual a aproximadamente 1 micrómetro y superior o igual a aproximadamente 0,1 micrómetros. En algunas realizaciones, el filtro tiene una clasificación de tamaño de poro inferior o igual a aproximadamente 0,1 micrómetros y superior o igual a aproximadamente 0,02 micrómetros.

En algunas realizaciones, el aparato comprende (a) una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo en la que la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica; y (b) cualquier combinación del electrodo de referencia, una sustancia de realización del ensayo que comprende al menos uno de (i) un compañero de unión marcado para un analito y (ii) un análogo marcado del analito, el correactivo de EQL y el filtro. En ciertas realizaciones, el aparato es un elemento consumible o reemplazable en un instrumento más grande, por ejemplo, para evitar que el instrumento más grande entre en contacto con la solución electrolítica (que puede contener una muestra que comprende un analito que se desea que se detecte). En algunas de estas realizaciones, el aparato comprende la sustancia de realización del ensayo en una composición seca y una barrera de vapor que encierra la sustancia de realización del ensayo.

En algunas realizaciones, el aparato comprende cualquiera de las realizaciones anteriores (por ejemplo, un aparato que comprende una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo

capacitivo en la que la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica que puede estar en contacto simultáneamente con dicho electrodo de trabajo faradaico y dicho contraelectrodo capacitivo), más una fuente de energía eléctrica susceptible de ser eléctricamente conectable al electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo. En consonancia con los principios de la invención, existen muchas fuentes de energía eléctrica posibles. La energía eléctrica aplicada a la célula electroquímica puede generarse usando instrumentación convencional, tal como potencióstatos, galvanostatos y/o instrumentos similares. En algunas realizaciones, puede usarse una fuente de tensión, una fuente de corriente, una fuente de carga y/o una fuente de energía con una constante o una forma de onda variable en el tiempo que comprenda los desplazamientos, etapas, rampas, sinusoides y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, puede usarse un tercer electrodo como mecanismo de retroalimentación para controlar la tensión a través del electrodo de trabajo faradaico. En algunas realizaciones, la energía puede provenir de un almacenamiento local de energía, tal como una batería, supercondensador, volante y/o una fuente de hidrocarburos (por ejemplo, gasolina y/o metano). En algunas realizaciones, un dispositivo fotovoltaico puede proporcionar la energía. En algunas realizaciones, de alimentación de la red de corriente alterna puede usarse. En algunas realizaciones, los dispositivos semiconductores pueden utilizar el acumulador de energía para controlar la carga, la tensión y/o la corriente aplicada a los electrodos con el tiempo. En algunas realizaciones, se usa un dispositivo informático (por ejemplo, un microprocesador, un microcontrolador o un ordenador) para controlar la aplicación de energía eléctrica a la célula electroquímica.

En algunas realizaciones, el aparato comprende cualquiera de las realizaciones anteriores (por ejemplo, un aparato que comprende 1. una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo en la que la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica que, simultáneamente, puede poner en contacto dicho electrodo de trabajo faradaico y dicho contraelectrodo capacitivo y 2. una fuente de energía eléctrica susceptible de ser eléctricamente conectable al electrodo de trabajo faradaico y al contraelectrodo capacitivo), más un imán situado de manera que sea capaz de ejercer una fuerza magnética sobre las partículas magnetizables situadas en el electrodo de trabajo faradaico.

En algunas realizaciones, el imán puede moverse de forma reversible de su posición por debajo del electrodo faradaico para reducir la fuerza magnética aplicada sobre perlas magnetizables en la muestra por el imán.

En algunas realizaciones, el imán puede comprender o bien un imán permanente o un electroimán.

En algunas realizaciones, el imán puede comprender un imán dipolar, un imán sándwich o un imán de canal.

En algunas realizaciones, el aparato comprende cualquiera de las realizaciones anteriores (por ejemplo, un aparato que comprende 1. una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo en la que la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica que, simultáneamente, puede poner en contacto dicho electrodo de trabajo faradaico y dicho contraelectrodo capacitivo y 2. una fuente de energía eléctrica susceptible de ser eléctricamente conectable al electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo), además de un fotodetector situado para detectar la luz emitida en el electrodo de trabajo faradaico. En algunas realizaciones, el fotodetector puede ser un tubo fotomultiplicador, un fotodiodo, un dispositivo CMOS o un dispositivo de carga acoplada.

En algunas realizaciones, el aparato comprende cualquiera de las realizaciones anteriores (por ejemplo, un aparato que comprende 1. una célula electroquímica que comprende un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo en la que la célula electroquímica es capaz de recibir una solución electrolítica que, simultáneamente, puede poner en contacto dicho electrodo de trabajo faradaico y dicho contraelectrodo capacitivo y 2. una fuente de energía eléctrica susceptible de ser eléctricamente conectable al electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo), además de una bomba dispuesta para ser capaz de mover el líquido a través de o sobre el electrodo de trabajo faradaico. En algunas realizaciones, la bomba puede modelarse como una fuente de presión (por ejemplo, una bomba de impulsión, una que utiliza la gravedad o una bomba basada en la acción capilar) o como una fuente de velocidad de volumen (por ejemplo, una bomba peristáltica, bomba de jeringa, bomba de engranajes o bomba de desplazamiento positivo). En algunas realizaciones, la bomba mueve líquido a través del electrodo de trabajo faradaico. En algunas realizaciones, la bomba está dispuesta para que sea capaz de mover líquido a través de o sobre el electrodo de trabajo faradaico mediante el uso de presiones manométricas positivas. En algunas realizaciones, la bomba está dispuesta para que sea capaz de mover líquido a través de o sobre el electrodo de trabajo faradaico mediante el uso de presiones manométricas negativas. En algunas realizaciones que comprenden un filtro, la bomba puede usarse para retirar filtrado del filtro; por ejemplo, el fluido puede moverse a través del filtro por flujo de gravedad o por presión, en el que se aplica presión manométrica positiva aguas arriba del filtro o se aplica presión manométrica negativa (vacío) corriente abajo del filtro. Este filtrado puede, por ejemplo, dispensarse en la célula electroquímica y sobre el electrodo de trabajo faradaico. En algunas realizaciones que comprenden una célula de flujo, la bomba puede usarse para el transporte de fluidos dentro y fuera de la célula de flujo.

La célula electroquímica puede usarse en conjunto con diversos sistemas de automatización, tales como un mecanismo de accionamiento automático o un dispositivo de alineación para provocar el movimiento relativo entre la célula y los electrodos. Un aparato de ejemplo que comprende una célula de flujo que comprende una célula de flujo que comprende un contraelectrodo capacitivo y un electrodo de trabajo faradaico puede comprender adicionalmente

una bomba para aspirar y/o dispensar fluidos dentro y fuera de la célula de flujo y una fuente de energía eléctrica para accionar los electrodos. En algunas realizaciones, el aparato de ejemplo puede comprender adicionalmente una estación de manipulación de fluidos para la introducción de uno o más reactivos y/o una o más muestras que pueden incluir gases y líquidos. La estación de manejo de fluidos puede comprender válvulas de control de flujo, así como un colector para la aceptación de un pipeteador para aspirar/dispensar fluidos desde una o más ubicaciones en la célula. También puede haber presentes válvulas de control de flujo adicionales, así como detectores de reactivo/gas.

Cuando se aplica un potencial a una célula electroquímica con un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo, los electrones atraviesan la interfaz del electrodo faradaico y se acumula una carga en el electrodo capacitivo. La acumulación de carga en el contraelectrodo puede describirse mediante la ecuación para un capacitor en un circuito eléctrico:  $q/V = C$ , donde  $q$  es la carga en el condensador (en culombios),  $V$  es el potencial a través del condensador (en voltios) y  $C$  es la capacitancia (en faradios). La capacitancia de un electrodo puede cambiar en función del potencial aplicado al sistema; por ejemplo, la distancia entre la capa doble y el electrodo puede aumentar a medida que aumenta la cantidad de carga en la doble capa. Para una buena aproximación, la capacidad capacitiva de un electrodo es proporcional al área superficial expuesta a la solución. Esta área superficial electroquímica puede ser superior al área superficial geométrica macroscópica haciendo rugosa la superficie. La relación del área superficial electroquímica con respecto al área superficial geométrica macroscópica puede ser, por ejemplo, de 1 a 1000 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000. La relación del área superficial electroquímica para el área superficial geométrica macroscópica puede ser, por ejemplo, superior o igual a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 30, aproximadamente 100, aproximadamente 300 o aproximadamente 1.000. Los métodos para aumentar la rugosidad y, por tanto, aumentar la superficie electroquímica incluyen la abrasión mecánica (por ejemplo, mediante el uso de papel de lija y/o chorro de arena), el grabado por plasma, la irradiación de haz de iones y/o electrones, la deposición de un recubrimiento rugoso (por ejemplo, usando técnicas tales como la pulverización térmica, el chapado o la electrodeposición, chorro de tinta, pulverización catódica, deposición de vapor químico), el ataque químico, la ablación por láser y la modificación de la superficie electroquímica. Otros métodos para obtener una gran rugosidad incluyen el uso de un material de partida muy áspero como electrodo, por ejemplo, partículas sinterizadas, negro de platino, nanotubos de carbono y tintas de negro de carbono. Para añadirse eficientemente al área superficial electroquímica, la dimensión característica de la rugosidad es preferentemente (pero no necesariamente) superior a aproximadamente 1 nm de manera que los iones pueden entrar fácilmente en contacto con la totalidad del área.

Cuando se emplea una fuente de tensión para impulsar un contraelectrodo capacitivo y un electrodo de trabajo faradaico, la corriente disminuye con el tiempo ya que la carga está atrapada en el contraelectrodo (véase la Figura 2). Se podría esperar que la cantidad de corriente en el electrodo de trabajo esté limitada por la cantidad de carga que puede estar contenida en el contraelectrodo a la tensión aplicada durante el funcionamiento de la célula electroquímica, lo que se determina mediante la capacitancia del electrodo; sin embargo, la presente invención contempla varios métodos de generación de corriente adicional, si se desea corriente adicional.

De acuerdo con la invención, un mecanismo para poner en contacto diferentes contraelectrodos capacitivos o diferentes áreas de los mismos contraelectrodos capacitivos a una solución electrolítica que está en contacto con el electrodo de trabajo faradaico. Al exponer partes nuevas del contraelectrodo, la capacidad aumenta aumentando de este modo la cantidad de corriente que puede conducirse a través del electrodo de trabajo. En algunas realizaciones, las partes del contraelectrodo que están cargadas pueden usarse durante el resto de la vida útil de la célula. En algunas realizaciones, las partes del contraelectrodo que están cargadas pueden descargarse a través del contacto con el aire, a través del contacto con otra solución en una célula diferente, a través de la corriente de fuga del electrodo o invirtiendo la dirección de la corriente. Mediante la exposición continua de partes nuevas del contraelectrodo, las corrientes faradaicas en el electrodo de trabajo pueden estar limitadas en el transporte de masa por los reactivos en el electrodo de trabajo.

La Figura 6 muestra una realización de ejemplo de una célula cuya área de contraelectrodo expuesta a la solución cambia con el tiempo. El electrodo de trabajo faradaico (201) puede permanecer estacionario en la célula, mientras que el contraelectrodo capacitivo puede moverse continuamente a través de la solución electrolítica. Por ejemplo, un alambre conductor o película recubierta con una capa delgada de aislante (202) puede hacerse pasar a través del electrolito (204) con una polarización fija como se muestra en la Figura 6. Los aniones (203) puede retirarse de la solución cuando se aplica una polarización negativa al electrodo de metal y el exceso de cationes puede dejarse en la solución para proporcionar electroneutralidad a la reacción faradaica catódica. De forma similar, los cationes pueden retirarse en el contraelectrodo capacitivo cuando el electrodo de trabajo es un ánodo. Como alternativa, puede usarse un electrodo de mercurio de flujo hidráulico con una superficie que se renueva continuamente si se opera en la región de potencial donde se comporta como un electrodo idealmente polarizado. Véase, para más detalles, I. M. Kolthoff, J. J. Lingane, *Polarography*, 2ª Ed, Vol. 1, Interscience Publishers, Nueva York, página 357, 1952. Un contraelectrodo capacitivo puede retirar iones de una sola polaridad (es decir, sin un contraión), donde la carga iónica puede ser compensada por la carga electrónica.

Las combinaciones de ejemplo de los componentes del aparato descrito anteriormente incluyen una célula electroquímica que comprende: un electrodo de trabajo faradaico; un contraelectrodo capacitivo; y una fuente de energía eléctrica. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un aparato que comprende una célula electroquímica que comprende: una célula capaz de recibir una solución electrolítica, un electrodo de trabajo faradaico; y un contraelectrodo capacitivo. En algunas realizaciones, la célula es una célula de flujo.

Las combinaciones de ejemplo de los componentes del aparato descrito anteriormente incluyen un aparato que comprende una célula electroquímica utilizada para realizar un ensayo de unión para un analito en una muestra basada en la medición de electroquimioluminiscencia en una superficie de electrodo de trabajo faradaico, comprendiendo la célula electroquímica: una célula para recibir una solución que comprende (a) muestra que comprende el analito y (b) un compañero de unión marcado para el analito en el que el compañero de unión marcado comprende un resto EQL; un electrodo de trabajo faradaico que tiene una superficie de electrodo expuesta y situada adyacente a una porción de la muestra que contiene el volumen; un contraelectrodo capacitivo que tiene la superficie de electrodo expuesta a y situada adyacente a una porción de la muestra que contiene volumen; una fuente de energía eléctrica suficiente para generar luminiscencia; un imán para recoger las perlas a lo largo de la superficie del electrodo de trabajo faradaico; y un fotodetector para medir la cantidad de luminiscencia generada y, de este modo, la cantidad de analito en la muestra.

Las combinaciones de ejemplo de los componentes del aparato descrito anteriormente incluyen un aparato que comprende una célula electroquímica para su uso en el análisis de una muestra que se sospecha que contiene uno o más analitos que comprenden: un filtro conectado fluidamente a un dispositivo de muestreo; una bomba dispuesta para que sea capaz de conducir el flujo de líquido a través del filtro; una célula para recibir una muestra filtrada que se sospecha que contiene uno o más analitos; al menos un electrodo de trabajo faradaico; y al menos un contraelectrodo capacitivo; y medios para medir la cantidad de analito en la muestra.

#### **IV: Métodos de ejemplo**

La invención también contempla métodos de uso, por ejemplo, de realizaciones del aparato descritas anteriormente. Estos métodos de uso incluyen métodos de ensayo para determinar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra.

En algunas realizaciones, el método para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra comprende las etapas de poner en contacto tanto un electrodo de trabajo faradaico como un contraelectrodo capacitivo con una solución que comprende la muestra y un electrolito; suministrar energía eléctrica entre el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo suficiente para proporcionar la transferencia de carga faradaica en el electrodo de trabajo faradaico; medir la luz para determinar la presencia o cantidad del analito en la muestra.

En algunas realizaciones, el método para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra comprende las etapas de acuerdo con la reivindicación 16.

Pueden usarse diversas propiedades o combinaciones de propiedades de las mediciones físicas de luz, corriente, tensión y/o carga para determinar la cantidad de analito en la muestra; por ejemplo, puede usarse la longitud de onda, la frecuencia, la energía, la intensidad, la polaridad, la polarización, la amplitud, la forma de onda y/o la dependencia del tiempo.

En particular, la solución utilizada en la determinación de la presencia o cantidad de un analito en una muestra comprende adicionalmente un resto EQL, por ejemplo, aquellos restos EQL que comprenden rutenio u osmio. En algunas realizaciones, la solución comprende adicionalmente un correactivo de EQL, por ejemplo, aminas terciarias con y sin grupos funcionales hidrófilos, aminas terciarias con grupos alquilo que comprenden opcionalmente grupos funcionales hidrófilos, tampones biológicos con aminas terciarias y/o oxalato. En algunas realizaciones, la energía eléctrica suministrada entre el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo capacitivo es suficiente para inducir la electroquimioluminiscencia y la cantidad de analito en la muestra se determina mediante la medición de la luminiscencia. En algunas realizaciones, la solución comprende adicionalmente al menos uno de entre un compañero de unión marcado para un analito y un análogo marcado del analito. En algunas realizaciones, la solución comprende adicionalmente un segundo compañero de unión para el analito en la que el segundo compañero de unión está unido a un soporte. En algunas realizaciones, el soporte es una perla magnetizable.

En algunas realizaciones, el método para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra comprende la etapa de preprocesamiento de la muestra. El preprocesamiento puede ser, por ejemplo, filtrar la muestra a través de un filtro para formar un filtrado. Las clasificaciones de tamaño de poro de ejemplo del filtro son las comprendidas en los intervalos de 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y de aproximadamente 0,02  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ . Otras etapas preprocesamiento pueden ser, por ejemplo, mezclar la muestra con un reactivo cuyo pH sea superior a 8 o inferior a 6 y tenga una osmolaridad superior o igual a 0,1 osmol/l. Otras etapas preprocesamiento pueden ser, por ejemplo, mezclar la muestra con un reactivo cuya osmolaridad sea superior o igual a 1,1 osmol/l.

En algunas realizaciones, los métodos de ensayo pueden comprender las etapas de inducir un resto EQL en solución para emitir luz mediante la aplicación de una forma de onda eléctrica que induce electroquimioluminiscencia al electrodo de trabajo en presencia del resto EQL; y medir la luminiscencia emitida por el resto EQL. En algunas realizaciones, los métodos de ensayo pueden comprender la etapa de añadir un segundo compañero de unión unido a un soporte (por ejemplo, una perla magnetizable). En algunas realizaciones que usan perlas magnetizables, el método puede comprender las etapas de recoger magnéticamente las perlas magnetizables a lo largo de la superficie del electrodo de trabajo faradaico a través del uso de un imán (por ejemplo, un imán permanente o un electroimán) que opcionalmente puede retirarse de forma reversible desde su ubicación debajo del electrodo de trabajo faradaico.

En algunas realizaciones, los métodos de ensayo pueden emplear un flujo de corriente faradaica a través del electrodo de trabajo faradaico que alterna su dirección para reducir el potencial a través del contraelectrodo capacitivo.

La presente invención puede usarse para procesos coulombimétricos, por ejemplo, en células electroquímicas a escala micro y nanométrica. En particular, la presente invención puede usarse para reducir la generación de un producto indeseable o destructivo en el contraelectrodo en una célula electroquímica. En algunas realizaciones, la presente invención puede usarse en ensayos electroquimioluminiscentes donde la cantidad de un analito en una muestra puede determinarse por la cantidad de luz generada en el electrodo de trabajo, por ejemplo, en ensayos de EQL a escala nanométrica donde los productos electroquímicos generados en el contraelectrodo tienen tiempo suficiente para difundir cerca del electrodo de trabajo y pueden interferir con el ensayo.

Las muestras que pueden analizarse usando una célula electroquímica de la presente invención pueden comprender al menos un analito. La medición de un analito en la muestra puede realizarse mediante cualquiera de las numerosas técnicas disponibles en la técnica de los ensayos biológicos, incluyendo, pero no limitadas a, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, ensayos basados en cultivo celular, ensayos de aglutinación, inmunoensayos (u otros formatos de ensayo basados en el uso de compañeros de unión específicos del marcador de interés), ensayos de inmunocromatografía, ensayos enzimáticos, etc. El método de detección puede ser un ensayo de unión, tal como un inmunoensayo, y la detección puede realizarse poniendo en contacto una composición de ensayo con uno o más compañeros de unión del analito. En ciertas realizaciones, el ensayo utiliza un formato de ensayo de unión de tipo sándwich o competitivo. Se describen ejemplos de inmunoensayos de tipo sándwich realizados en tiras de ensayo en la Patente de los EE.UU. N.º 4.168.146 de Grubb et al. y la Patente de los EE.UU. N.º 4.366.241 de Tom et al. Los ejemplos de dispositivos de inmunoensayos competitivos adecuados para su uso con la presente invención incluyen los que se desvelan en la Patente de los EE.UU. N.º 4.235.601 de Deutsch et al., la Patente de los EE.UU. N.º 4.442.204 de Liotta y la Patente de los EE.UU. N.º 5.208.535 de Buechler et al. En ciertas realizaciones, al menos uno de los compañeros de unión empleados en un ensayo de este tipo se inmoviliza sobre un soporte. En algunas realizaciones, se usa un compañero de unión marcado y/o un análogo marcado del analito en las reacciones de unión. En algunas realizaciones, el compañero de unión marcado comprende un resto EQL.

Un compañero de unión puede inmovilizarse sobre el soporte mediante cualquier medio convencional, por ejemplo, adsorción, absorción, unión no covalente, unión covalente con un agente de reticulación o enlace covalente resultado de la activación química de uno o los dos de entre el soporte o el compañero de unión. En algunas realizaciones, la inmovilización del compañero de unión mediante el soporte puede realizarse usando un par de unión. Por ejemplo, un miembro del par de unión, por ejemplo, estreptavidina o avidina, puede unirse al soporte y el otro miembro del mismo par de unión, por ejemplo, biotina, puede unirse al primer compañero de unión. Se desvelan medios adecuados para la inmovilización de un compañero de unión sobre el soporte, por ejemplo, en el catálogo de Pierce, Pierce Chemical Company, apartado postal 117, Rockford, Ill. 61105, 1994.

#### **A. Determinados métodos de ensayo**

Pueden realizarse ensayos de unión usando perlas magnetizables como soporte para un ensayo de unión en fase sólida usando un diseño basado en células de flujo con células de flujo reutilizables permanentes o células reemplazables de un solo uso. Pueden recogerse complejos que comprenden un resto EQL que se unen a perlas magnetizables en un electrodo en la célula de flujo con la ayuda de un imán, por ejemplo, un imán dipolar, un imán sándwich, un imán de canal y/o un electroimán. Los marcadores de las perlas recogidas pueden inducirse para emitir EQL mediante la aplicación de un potencial a los electrodos y la EQL puede medirse para medir la cantidad de marcador. El método de ensayo de EQL también puede comprender la etapa de introducir un correactivo de EQL antes de la aplicación del potencial inductor de EQL.

En ciertas realizaciones, un inmunoensayo de tipo sándwich en fase sólida puede ejecutarse usando la célula electroquímica de la presente invención. Se usan dos anticuerpos dirigidos contra el analito: i) un anticuerpo de captura que está unido o es capaz de unirse (por ejemplo, mediante la formación de un par de unión específico tal como una interacción biotina-estreptavidina) a una fase sólida y ii) un anticuerpo de detección que está unido o es capaz de unirse (por ejemplo, mediante la formación de un par de unión específico tal como una interacción biotina-estreptavidina) a un marcador, por ejemplo, un resto EQL. Una muestra que comprende el analito solubilizado puede

ponerse en contacto con los dos anticuerpos y la fase sólida de manera que, en presencia del analito, los dos anticuerpos puedan unirse al analito para formar un "complejo de tipo sándwich" sobre la fase sólida que comprende el marcador. El marcador sobre la fase sólida puede medirse con el fin de medir el analito en la muestra.

- 5 La muestra puede introducirse en la célula tal cual se recoge o la muestra puede someterse a una o más etapas de preparación. Véase, por ejemplo, THE IMMUNOASSAY HANDBOOK, 3ª edición, editor David Wild, Elsevier, 2005.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede proporcionar un método de detección de un analito en una muestra que comprende las etapas de: proporcionar una célula para recibir una solución electrolítica y la muestra  
10 que puede comprender el analito; colocar la solución electrolítica en la célula; colocar la muestra en la célula; poner en contacto un electrodo de trabajo faradaico con la solución de muestra y el electrolito; poner en contacto un contraelectrodo capacitivo con la solución de muestra y el electrolito; suministrar energía eléctrica a los electrodos suficiente para proporcionar una transferencia de carga faradaica en el electrodo de trabajo faradaico que pueda generar un producto electroquímico; y determinar la cantidad de analito en la muestra.

15 En ciertas realizaciones, la presente invención puede proporcionar un método para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra que comprende las etapas de (1) formar una solución que comprende (a) la muestra, (b) un compañero de unión marcado específico para dicho analito en el que el marcador es un resto EQL, (c) un compañero de unión específico para dicho analito unido a una perla magnetizable, (d) un correctivo de EQL y  
20 (e) un electrólito; (2) poner en contacto un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo con la solución; (3) recoger las perlas a lo largo del electrodo de trabajo faradaico; (4) suministrar energía eléctrica a los electrodos para provocar que el resto EQL genere electroquimioluminiscencia repetidamente; (5) medir dicha electroquimioluminiscencia; y (6) determinar la presencia o cantidad de dicho analito a partir de la medición.

25 En algunas realizaciones, el método puede ser un método para analizar la muestra para determinar múltiples analitos. Por ejemplo, puede usarse una matriz de electrodos de trabajo faradaicos con uno o más contraelectrodos capacitivos en la que se usa una medición de uno o más electrodos de trabajo faradaicos para medir cada analito. Por ejemplo, puede usarse uno o más electrodos de trabajo faradaicos con uno o más contraelectrodos capacitivos en los que se mide más de un analito en cada electrodo de trabajo faradaico.

30 En algunas realizaciones, el método de generación de al menos un producto electroquímico en un electrodo de trabajo mientras se genera una cantidad discordantemente más pequeña de subproducto electroquímico en un contraelectrodo, comprende poner en contacto un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo con una solución electrolítica; y aplicar energía eléctrica entre el electrodo de trabajo faradaico y el contraelectrodo  
35 capacitivo en la que la carga faradaica transferida a través del electrodo de trabajo faradaico es superior a la carga faradaica transferida a través del contraelectrodo capacitivo.

La discordancia en la cantidad de subproducto formado, con respecto a la cantidad de producto formado, es principalmente resultado de la discordancia en la transferencia de carga faradaica en el electrodo de trabajo y en el  
40 contraelectrodo. En un aparato de la presente invención, y a diferencia del aparato electroquímico tradicional, la cantidad de carga transferida en el electrodo de trabajo faradaico es superior a la cantidad de carga que se transfiere en el contraelectrodo capacitivo. La diferencia en la cantidad de carga transferida en el electrodo de trabajo y en el contraelectrodo puede ser, por ejemplo, superior o igual a un factor de 5; 10; 30; 100; 300; 1.000; 3.000; 10.000, 100.000; o más. En algunas realizaciones, la discordancia en la transferencia de carga faradaica  
45 puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 30 a  
50 aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 300, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000.

En las células electroquímicas conocidas en la técnica, puede existir una diferencia en la cantidad de subproducto  
55 formado en el contraelectrodo, con respecto a la cantidad de producto formado en el electrodo de trabajo cuando las reacciones de semicélula que se producen en cada uno de estos electrodos requieren un número diferente de electrones. La diferencia entre la cantidad de producto electroquímico en el electrodo de trabajo faradaico y el subproducto electroquímico en el contraelectrodo capacitivo se determina mediante la estequiometría de las reacciones redox implicadas.

60 Teniendo en cuenta la discordancia en la transferencia de carga faradaica, la posibilidad de que pueda ser necesario un número diferente de electrones para cada una de las reacciones de semicélula y cualesquiera otros procesos que afecten a la cantidad de subproducto que se forma, se forma una cantidad discordante menor de subproducto en el contraelectrodo si la relación de producto a subproducto es superior o igual a un factor de aproximadamente 2;  
65 aproximadamente 5; aproximadamente 10; aproximadamente 30; aproximadamente 100; aproximadamente 300; aproximadamente 1.000; aproximadamente 3.000; aproximadamente 10.000, aproximadamente 100.000;

aproximadamente 200.000 o más. Por ejemplo, si la relación de la cantidad de carga faradaica transferida a través del electrodo de trabajo y el contraelectrodo es de 30 y todas las reacciones electroquímicas en el contraelectrodo requieren 1 electrón, mientras que todas las reacciones electroquímicas en el electrodo de trabajo requieren 2 electrones, entonces la relación de producto a subproducto sería de 15. En algunas realizaciones, la relación de producto a subproducto puede estar en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 200.000, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20.000, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 200.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 200.000, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 20.000, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 600, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200.000, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 20.000, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.000.

Pueden usarse métodos coulombiométricos para añadir una pequeña cantidad medible de una especie en un sistema, por ejemplo, en un nanosistema usando un ultramicroelectrodo (UME). Debido al tamaño pequeño de los nanosistemas, los separadores de células habituales no pueden emplearse fácilmente para evitar que los productos no deseados generados en el contraelectrodo se introduzcan en el sistema. La utilización de un sistema con un electrodo de trabajo faradaico y un contraelectrodo capacitivo puede permitir que ambos electrodos estén en contacto con la solución electrolítica en una sola célula, reduciendo o evitando al mismo tiempo la producción de productos no deseados.

Cuando se cambia la polaridad de la energía eléctrica aplicada a los electrodos con el tiempo, la corriente puede fluir alternativamente en ambas direcciones. Por ejemplo, el contraelectrodo capacitivo se carga a una gran tensión, la polaridad de la energía eléctrica puede invertirse para descargar el contraelectrodo capacitivo. Opcionalmente, el contraelectrodo puede cargarse con la polaridad opuesta. Durante este proceso de conmutación, el electrodo de trabajo faradaico puede actuar a su vez como ánodo y como cátodo (dependiendo de la dirección del flujo de corriente). Aunque el uso de dos electrodos faradaicos puede provocar que se produzcan tanto reacciones anódicas como catódicas al mismo tiempo en diferentes lugares, la presente invención permite que la reacciones anódicas y catódicas se produzcan en momentos diferentes en el mismo lugar. Esta separación temporal puede ser útil en varias circunstancias.

### **B. Métodos de separación temporal**

La separación temporal puede ser útil cuando el contraelectrodo y el electrodo de trabajo están suficientemente cerca de manera que los productos de reacción de un electrodo, si se generasen al mismo tiempo, podrían difundir a e interferir con la reacción en el otro electrodo. Por ejemplo, la generación in situ de cloro gaseoso a partir de iones cloruro en solución acuosa puede verse comprometida por la generación de iones hidróxido en un contraelectrodo faradaico por la formación de hipoclorito. A través de la separación en el tiempo, el producto deseado (por ejemplo, el cloro gaseoso) puede usarse o retirarse (por ejemplo, a través de difusión o convección) de los electrodos antes de que se produzca la reacción comprometedora. La retirada puede considerarse una separación temporal-espacial.

En algunas realizaciones, la separación temporal-espacial puede crearse haciendo fluir líquidos a través de los electrodos. El líquido corriente abajo del electrodo puede comprender, entonces, productos de reacción catódicos y anódicos alternantes. Por ejemplo, una solución que comprende oxígeno gaseoso disuelto y iones cloruro puede generar alternadamente cloro gaseoso y peróxido de hidrógeno corriente abajo de los electrodos. Esta combinación puede usarse, por ejemplo, para la descontaminación de un dispositivo o cartucho. En algunas realizaciones, las separaciones temporal-espaciales pueden crearse mediante productos de reacción que difieren en densidad (por ejemplo, un gas y un ion). Proporcionando tiempo al producto gaseoso para que difunda lejos del electrodo de trabajo antes de que se cree el ion, los productos de reacción pueden separarse.

En algunas realizaciones, los productos de reacción separados temporalmente no están separados espacialmente; más bien pueden usarse alternadamente in situ. Por ejemplo, el pH de una célula de reacción puede ajustarse alternadamente arriba y abajo en 1, 2, 3, 4 o más unidades de pH mediante la creación faradaica de iones hidróxido o hidronio. La ciclación del entorno químico en una región puede tener varios usos. Por ejemplo, puede hacerse un nuevo método de amplificación del ADN creando ciclos de separación de cadenas y renaturalización sin ciclar la temperatura como se hace en la PCR, pero ciclando el entorno químico.

### **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para describir con todo detalle la forma de uso de la invención descrita anteriormente. Se entiende que estos ejemplos no sirven de ningún modo para limitar el verdadero alcance de la presente invención, sino que se presentan con fines ilustrativos. Las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Si una abreviatura no está definida dentro de la solicitud, la abreviatura tiene su significado generalmente aceptado.

$\mu\text{m}$  = micrómetros o micras

A = amperio

|        |                          |
|--------|--------------------------|
| bpy    | = bipyridilo             |
| cm     | = centímetro             |
| p. ej. | = por ejemplo            |
| F      | = faradio                |
| M      | = molar                  |
| min    | = minuto                 |
| mm     | = milímetros             |
| mM     | = milimolar              |
| MV     | = milivoltios            |
| nA     | = nanoamperio            |
| nF     | = nanofaradio            |
| nm     | = nanómetro              |
| pA     | = picoamperio            |
| TFM    | = tubo fotomultiplicador |
| s      | = segundo                |
| TPA    | = tri-n-propilamina      |
| UME    | = ultramicroelectrodo    |
| V      | = voltios                |

#### Ejemplo 1

##### Medición de la corriente de Faraday en un electrodo de trabajo en una célula electroquímica que tiene un contraelectrodo capacitivo

Un alambre de Pt de 25  $\mu\text{m}$  de diámetro (101) sellado en una punta de UME (102) sirve como electrodo faradaico y se pone en contacto con una gota de unos pocos mm de diámetro de agua desionizada (MilliQ) colocada sobre la película de  $\text{SiO}_2$  (500 nm de espesor) sobre un disco de Si monocristalino (100) con una película aislante delgada de  $\text{SiO}_2$  que actuaba como el electrodo capacitivo. Se prepararon muestras de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  en SEMATECH (Austin, TX) por deposición de vapor químico sin tratamiento adicional. En experimentos en los que una gota de agua se movió a lo largo de la superficie de  $\text{SiO}_2$  con una polarización como se muestra esquemáticamente en la Figura 1, se fijó un tubo de vidrio de 2 mm de diámetro (103) a la punta de Pt de 25  $\mu\text{m}$  con parafilm para evitar fugas de agua. El tubo se sobrellenó ligeramente de manera que se formó una gota de agua (104) en su parte superior en contacto con la superficie de  $\text{SiO}_2$  y la gota se pudo mover horizontalmente para hacer contacto continuamente con una parte nueva de la superficie de óxido. La carga faradaica total inyectada en el electrodo de Pt está proporcionada por

$$Q_f = \int i \, dt - Q_{c,Pt} = \int i \, dt - C_{dl,Pt} A_{Pt} \Delta E = C_{dl,Si} A_{Si} \Delta E - C_{dl,Pt} A_{Pt} \Delta E \quad (1)$$

donde  $Q_f$  es la carga faradaica total inyectada,  $i$ , la corriente total,  $Q_{c,Pt}$ , la carga capacitiva en el electrodo de Pt,  $C_{dl,Pt}$ , la capacitancia integral del electrodo de Pt,  $C_{dl,Si}$ , la capacitancia integral del electrodo de Si,  $A_{Pt}$  y  $A_{Si}$ , las áreas de electrodos de Pt y Si, respectivamente y  $\Delta E$ , la polarización aplicada.

Una vez que la corriente se volvió insignificante, el circuito externo se desconectó durante aproximadamente 8 s. Cuando se volvió a conectar a la misma polarización, la corriente de carga fue significativamente más pequeña como se muestra en la Figura 2, (recuadro) en la que el pico agudo inicial era un artefacto electrónico resultante del acoplamiento capacitivo. Cuando el circuito se abrió durante un tiempo más largo, tal como de 15 a 20 s, la corriente de carga después de la reconexión no parecía muy diferente del recuadro de la Figura 2. Esto demuestra que las cargas electrónicas y iónicas llevadas a la interfaz de  $\text{SiO}_2$  por el potencial externo cambió solo ligeramente en el circuito abierto.

#### Ejemplo 2

##### Medición de la corriente faradaica en un electrodo de trabajo en movimiento en una célula electroquímica que tiene un contraelectrodo capacitivo

Usando el montaje descrito en el Ejemplo 1, la gota de agua (104) y el UME de Pt asociado (101) se movieron a través de la superficie de  $\text{SiO}_2$  con una polarización constante. Antes de movimiento, se aplicó una polarización de -1 V se aplicó a la punta y la superficie se cargó completamente. Después, la punta se movió lateralmente empujando

la platina de traslado (105) manualmente a una velocidad de aproximadamente 1 cm/s sobre una distancia de aproximadamente 0,5 a 4 cm sin desconectar la polarización y la corriente aumentó como se muestra en la Figura 3. La corriente alcanzó un estado estacionario en el nivel nA, que se mantuvo mediante la exposición continua a la superficie nueva. La corriente no cayó hasta que el movimiento terminó y la carga en esta ubicación se aproximó a la saturación (Figura 3). El área de contacto del electrodo de SiO<sub>2</sub> y la gota de agua se mantuvieron esencialmente constantes durante el movimiento lateral de la punta. La corriente de estado estacionario depende de lo rápido que se puso en contacto la superficie nueva. A una velocidad de movimiento de la punta de 25 μm/s, controlada con un motor de oruga agrimensora, la corriente de estado estacionario era de aproximadamente 3 pA (la corriente de fuga no fue detectable (suelo de ruido < 1 pA) con una capa de óxido gruesa de este tipo). El movimiento de 25 μm de la gota de agua en 1 s generó una nueva área de contacto correspondiente a una capacitancia de ~5 pF suponiendo un capacitor en paralelo con SiO<sub>2</sub> como material dieléctrico. En otras palabras, con una polarización de 1 V despreciando caídas de potencial en el electrodo de Pt y la resistencia de la solución, debe obtenerse una corriente máxima de ~5 pA en comparación con la corriente real de 3 pA realmente observada. A una velocidad baja de desplazamiento de la punta de este tipo, llevó varios minutos que la gota de agua se alejara completamente de su punto anterior. Probablemente, la carga almacenada en ambas interfaces de SiO<sub>2</sub> (iones en solución y carga electrónica en el Si) o bien no se movió o bien se movió demasiado lentamente para seguir la gota de agua. El comportamiento observado no dependió de la polaridad de la polarización aplicada al sistema. Cuando se introdujo un electrolito de soporte, tal como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, el sistema se cargó más rápidamente debido a la disminución de la resistencia de la solución. Sin embargo, las características básicas fueron las mismas.

Los resultados mostrados en la Figura 3 se pudieron reproducir muchas veces en diferentes lugares. También se obtuvieron resultados similares a medida que la punta viajó etapa a etapa, se repitió el modo de parada y avance, como se muestra en la Figura 4. Cada vez, la corriente de carga aumentó a medida que la gota de agua comenzó a moverse y se observó una corriente de carga de estado estacionario y disminuyó cuando la gota de agua dejó de moverse.

La superficie del electrodo capacitivo de SiO<sub>2</sub> era hidrófoba (ángulo de contacto con agua pura aproximadamente a 87 °C) y no quedó rastro visible de agua después de que la gota se alejó de un punto. En algunos casos, la gota de agua se movió en un patrón prediseñado de manera que la ubicación de cada parada pudiera revisarse más adelante. Cuando la gota de agua se movió de nuevo a esos puntos, que se habían cargado anteriormente por completo, después de un periodo de 10 a 20 min, no se pudo observar ninguna carga apreciable en las mismas condiciones de carga (la corriente de carga era comparable a la que se muestra en el recuadro de la Figura 1), lo que confirma que las cargas permanecieron en su punto original y no se movieron a ningún otro sitio. Además, las cargas almacenadas no se descargaron en un punto vecino que estaba aproximadamente a 7,5 mm de distancia, lo que indica que no había comunicación entre cargas almacenadas en diferentes lugares. Independiente de la historia de carga, todos los puntos pudieron restablecerse a su estado inicial descargando el Si en condiciones de cortocircuito. Estos hallazgos coinciden con estudios anteriores de la emersión de un electrodo metálico de la solución a alto vacío, lo que indicó que la doble capa formada en la solución todavía existía en la cámara de alto vacío después de la carga del electrodo metálico en solución y después transferencia a vacío con una polarización. Véase Hansen, et al., *J. Electroanal. Chem.*, 1978, 93, 87 para más detalles.

Se observó una corriente de carga estacionaria normal cuando la punta estaba estacionaria y el potencial se barrió a una velocidad de 100 mV/s como se muestra en el recuadro de la Figura 3. La capacitancia calculada ( $C = i/v$ , donde  $i$  y  $v$  son la corriente y la velocidad de barrido, respectivamente) de 0,577 nF que correspondía a 6,9 nF/cm<sup>2</sup> a partir de este resultado se ajustó a un valor para un capacitor en paralelo ideal usando SiO<sub>2</sub> como material dieléctrico ( $C = \epsilon \epsilon_0 A/d$ , donde  $\epsilon$  es la permitividad relativa del material dieléctrico, 3,9 para SiO<sub>2</sub>;  $\epsilon_0$  la permitividad del espacio;  $A$  el área y  $d$  es 500 nm, el espesor de SiO<sub>2</sub>) con un diámetro de 3,2 mm, que se correspondía estrechamente con el área real en contacto con la gota.

## Ejemplo 3

### Medición de EQL en una célula electroquímica que tiene un contraelectrodo capacitivo

Un alambre de Pt de 250 μm se dobló en un ángulo recto, se recubrió con cemento epoxi y después se pulió para exponer un área de aproximadamente 0,02 mm<sup>2</sup> enfrentada a un tubo fotomultiplicador (TFM, R4220p, Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Un trozo de Si con un área de ~40 cm<sup>2</sup> y recubierto con una película de SiO<sub>2</sub> de ~50 nm de espesor se usó como contraelectrodo en una solución acuosa que contenía Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 0,5 mM [tris(2,2'-bipiridina)rutenio (II)] en tri-n-propilamina (TPA) 0,10 M con tampón de Tris 0,10 M/LiClO<sub>4</sub> 0,10 M (pH = 8). Se usó un potenciostato Autolab (Modelo PGSTAT100, EcoChemie, Utrecht, Países Bajos) para controlar el potencial aplicado con Pt como electrodo de trabajo y contacto posterior de Si como contraelectrodo. La entrada de electrodo de referencia en el potenciostato se conectó al contraelectrodo. La emisión de EQL y la corriente se registraron simultáneamente durante la medición. Se aplicaron pulsos de potencial de 1,4 V (30 s) a -0,5 V (20 s) al sistema Pt/solución/SiO<sub>2</sub>/Si. En una medición separada para obtener una imagen de EQL, se usó una punta de UME de Pt de 25 μm con la misma solución sobre una superficie de Si/SiO<sub>2</sub> de 9 cm<sup>2</sup> montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon, Modelo TE300, Melville, NY). Para opciones experimentales adicionales véase también Bard, A. J.; Ed., *Electrogenerated Chemiluminescence*, Marcel Dekker, Nueva York, 2004 y Miao, et al., *J. Am.*

*Chem. Soc.*, 2002, 124.14478 y las referencias en los mismos.

5 Se generó EQL mediante etapas de potencial aplicadas entre un electrodo de Pt de 0,02 mm<sup>2</sup> y un electrodo de Si/SiO<sub>2</sub> (40 cm<sup>2</sup>). Como se muestra en la Figura 5, se detectó EQL inmediatamente después de la aplicación de un pulso de potencial de 1,4 V al electrodo de Pt, lo que desencadenó un proceso de carga negativa en la superficie de SiO<sub>2</sub>. A medida que disminuyó la corriente de carga, la intensidad de emisión EQL disminuyó. La corriente decreciente en este caso representa la carga del contraelectrodo en lugar del agotamiento de reactivo habitual en el electrodo de Pt. Como era de esperar, no se observó EQL con una polarización negativa de -0,5 V, que sirvió, sin embargo, para descargar la interfaz en el electrodo de Si/SiO<sub>2</sub> (con una reacción faradaica correspondiente en el electrodo de Pt). Este ciclo pudo repetirse muchas veces y la intensidad de EQL disminuyó ligeramente cada vez probablemente debido al agotamiento de las especies activas cercanas a la superficie del electrodo de Pt. No se detectó EQL en el electrodo bloqueado cuya corriente de fuga, por tanto, era insignificante. En una medición diferente, con una punta de Pt de 25 μm sobre un electrodo de Si/SiO<sub>2</sub> de 9 cm<sup>2</sup> con la misma solución de Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/TPA con una polarización constante de 1,4 V, se observó claramente una imagen de EQL de la punta de Pt con un microscopio invertido como se muestra en el recuadro de la Figura 5. La producción EQL proporciona una prueba clara de un proceso faradaico en el sistema electroquímico de electrodo único y muestra que puede generarse EQL en una microcélula sin interferencia de reacciones del contraelectrodo.

20 La descripción anterior de posibles implementaciones coherentes con la presente invención no representa una lista exhaustiva de todas las implementaciones de este tipo ni todas las variaciones de las implementaciones descritas. La descripción de solo algunas implementaciones no debe interpretarse como una intención de excluir otras implementaciones. Los expertos entenderán cómo poner en práctica la invención en las reivindicaciones adjuntas de muchas otras maneras, usando equivalentes y alternativas que no se aparten del alcance de las siguientes reivindicaciones.

25

# REIVINDICACIONES

1. Un aparato que comprende una célula electroquímica que comprende:

5 un electrodo de trabajo faradaico (101, 201); al menos un contraelectrodo capacitivo (200); un fotodetector posicionado para detectar la luz emitida sobre, en y/o cerca del electrodo de trabajo faradaico; y un mecanismo para poner en contacto contraelectrodos capacitivos diferentes o áreas diferentes de los mismos contraelectrodos capacitivos con una solución electrolítica que está en contacto con el electrodo de trabajo faradaico, en donde la célula electroquímica es susceptible de recibir una solución electrolítica (104), (204) que  
10 puede estar en contacto simultáneamente con dicho electrodo de trabajo faradaico y dicho al menos un contraelectrodo capacitivo.

2. El aparato de la Reivindicación 1 en el que el al menos un contraelectrodo capacitivo comprende un material semiconductor con una capa de óxido.  
15

3. El aparato de la Reivindicación 1 o de la Reivindicación 2 en el que el electrodo de trabajo faradaico es un ultramicroelectrodo.

4. El aparato de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente una sustancia de realización del ensayo que comprende un compañero de unión marcado para un analito o un análogo marcado del analito.  
20

5. El aparato de la Reivindicación 4 en el que la sustancia de realización del ensayo comprende un resto EQL que comprende un ión metálico seleccionado entre osmio y rutenio.  
25

6. El aparato de la Reivindicación 5 que comprende adicionalmente un correctivo de EQL.

7. El aparato de la Reivindicación 6 en el que el correctivo de EQL comprende una amina terciaria.

8. El aparato de la Reivindicación 6 en el que el correctivo de EQL comprende una amina terciaria que comprende un grupo funcional hidrófilo.  
30

9. El aparato de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-8 que comprende adicionalmente un filtro en conexión fluida con el electrodo de trabajo faradaico y el al menos un contraelectrodo capacitivo.  
35

10. El aparato de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-9 que comprende adicionalmente una segunda sustancia de realización del ensayo que comprende un compañero de unión para el analito unido a un soporte.

11. El aparato de la Reivindicación 10 en el que el soporte es una perla magnetizable.  
40

12. El aparato de la Reivindicación 11 que comprende adicionalmente un imán para recoger perlas magnetizables en la superficie del electrodo de trabajo faradaico.

13. El aparato de la Reivindicación 12 en el que el imán puede retirarse de forma reversible desde una posición por debajo del electrodo de trabajo faradaico.  
45

14. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-13 que comprende adicionalmente una bomba dispuesta para que sea capaz de mover líquido a través o sobre el electrodo faradaico.

15. El aparato de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que el electrodo de trabajo faradaico y el al menos un contraelectrodo capacitivo están situados en una célula de flujo y el movimiento de al menos un producto oxidante y al menos un producto reductor alejándose de la superficie del electrodo de trabajo faradaico se ve facilitado por un flujo de la solución electrolítica a través de la célula de flujo.  
50

16. Un método de determinación de la presencia o la cantidad de un analito en una muestra usando el aparato de las reivindicaciones 1-15 y que comprende las etapas de:  
55

(a) preprocesar opcionalmente la muestra;

(b) poner en contacto un electrodo de trabajo faradaico con una solución que comprende:  
60

la muestra opcionalmente preprocesada;

un resto EC1; y

un electrolito;

(c) poner en contacto al menos un contraelectrodo capacitivo con la solución;  
65

(d) suministrar energía eléctrica entre el electrodo de trabajo faradaico y el al menos un contraelectrodo

capacitivo suficiente para proporcionar transferencia de carga faradaica en el electrodo de trabajo faradaico;  
(e) medir la luz para determinar la presencia o la cantidad del analito en la muestra.

- 5 17. Un método de acuerdo con la Reivindicación 16, en el que la carga faradaica transferida a través del electrodo de trabajo faradaico es al menos aproximadamente 10 veces la carga faradaica transferida a través del al menos un contraelectrodo capacitivo, generando de este modo una cantidad discordantemente menor de subproducto electroquímico en el contraelectrodo, y en donde la energía eléctrica aplicada alterna en la polaridad para formar al menos un producto oxidante y al menos un producto reductor en el electrodo de trabajo faradaico.

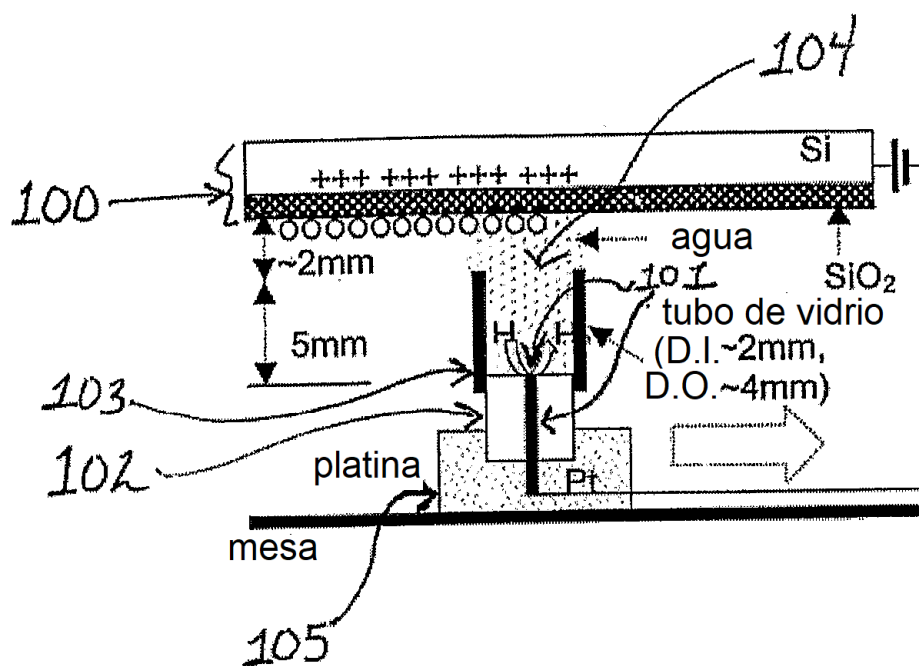


FIGURA 1

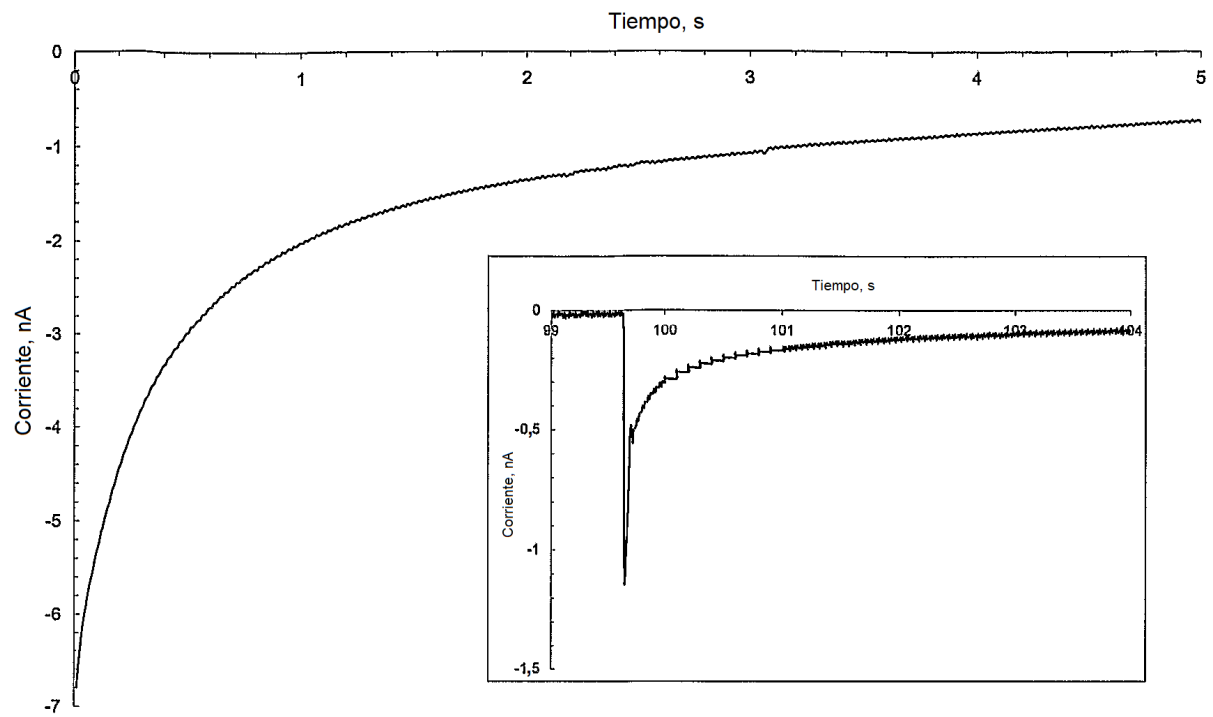


FIGURA 2

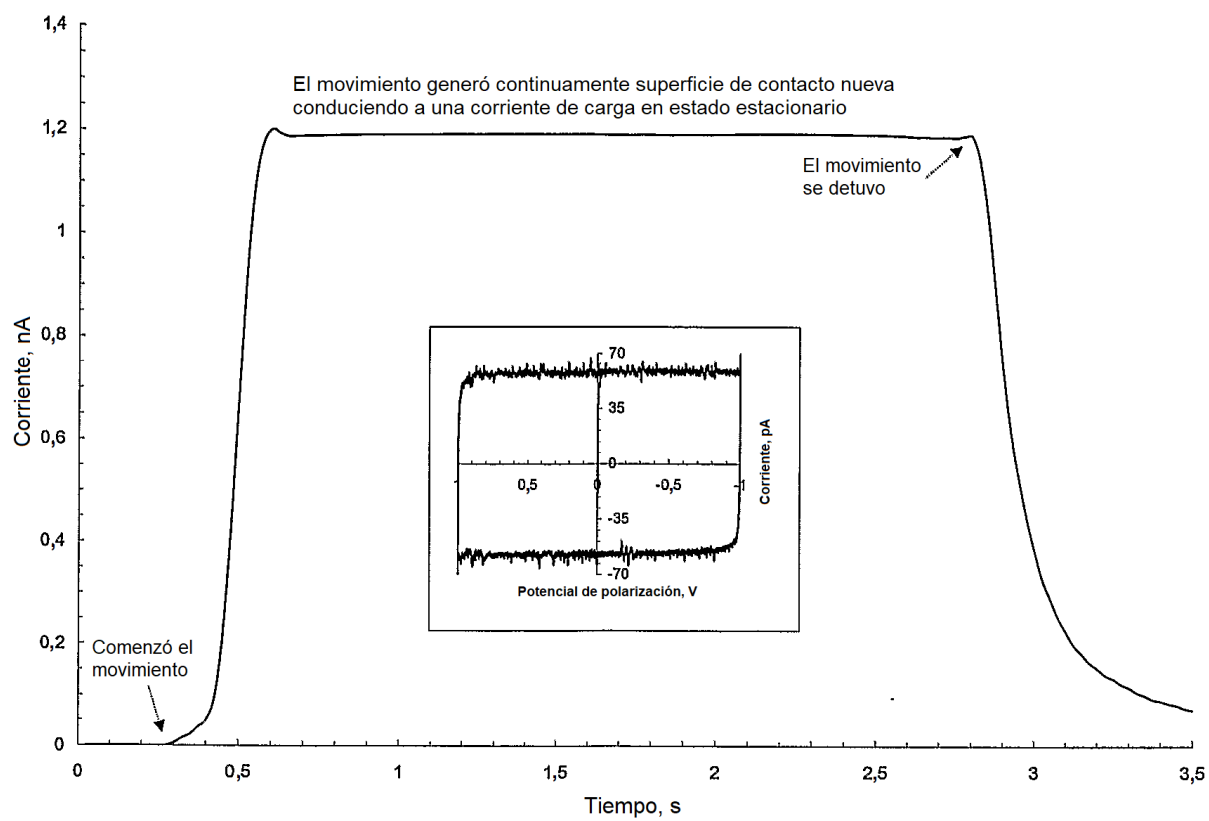


FIGURA 3

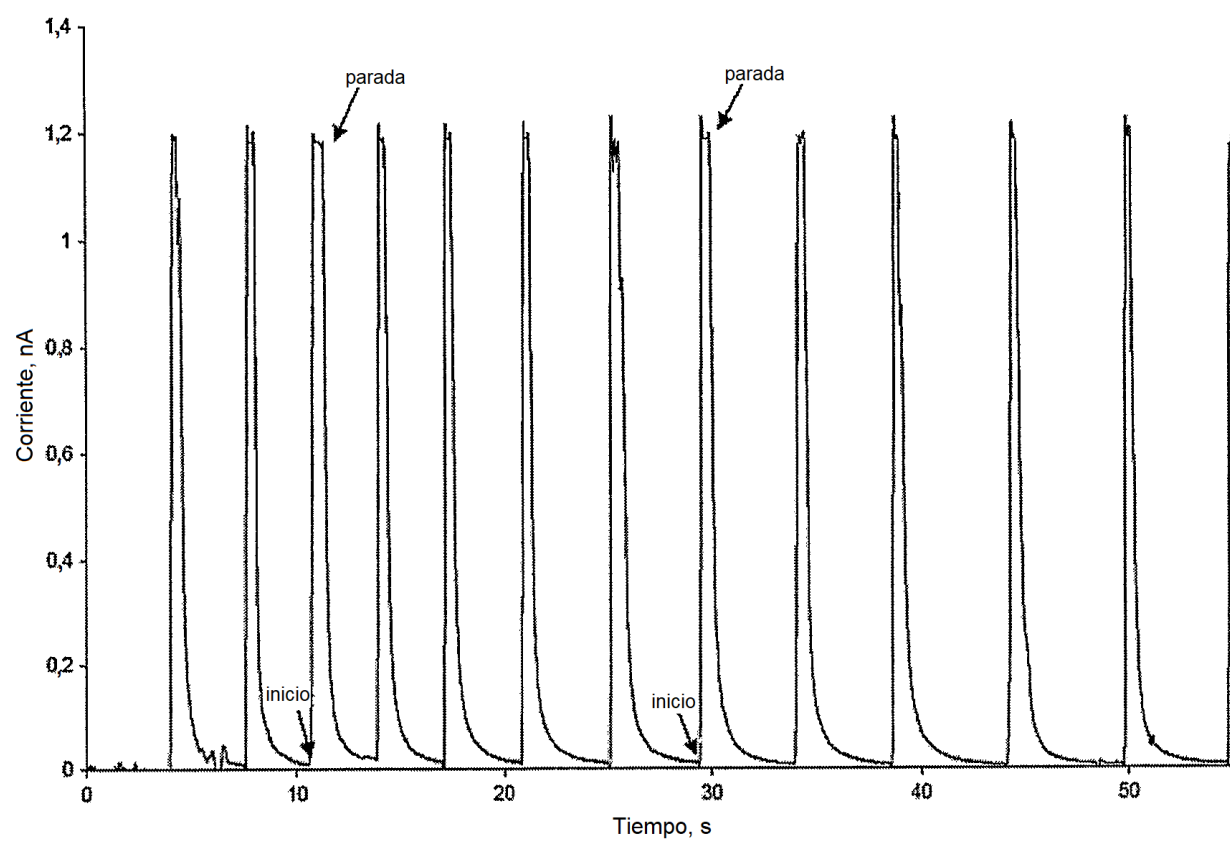


FIGURA 4

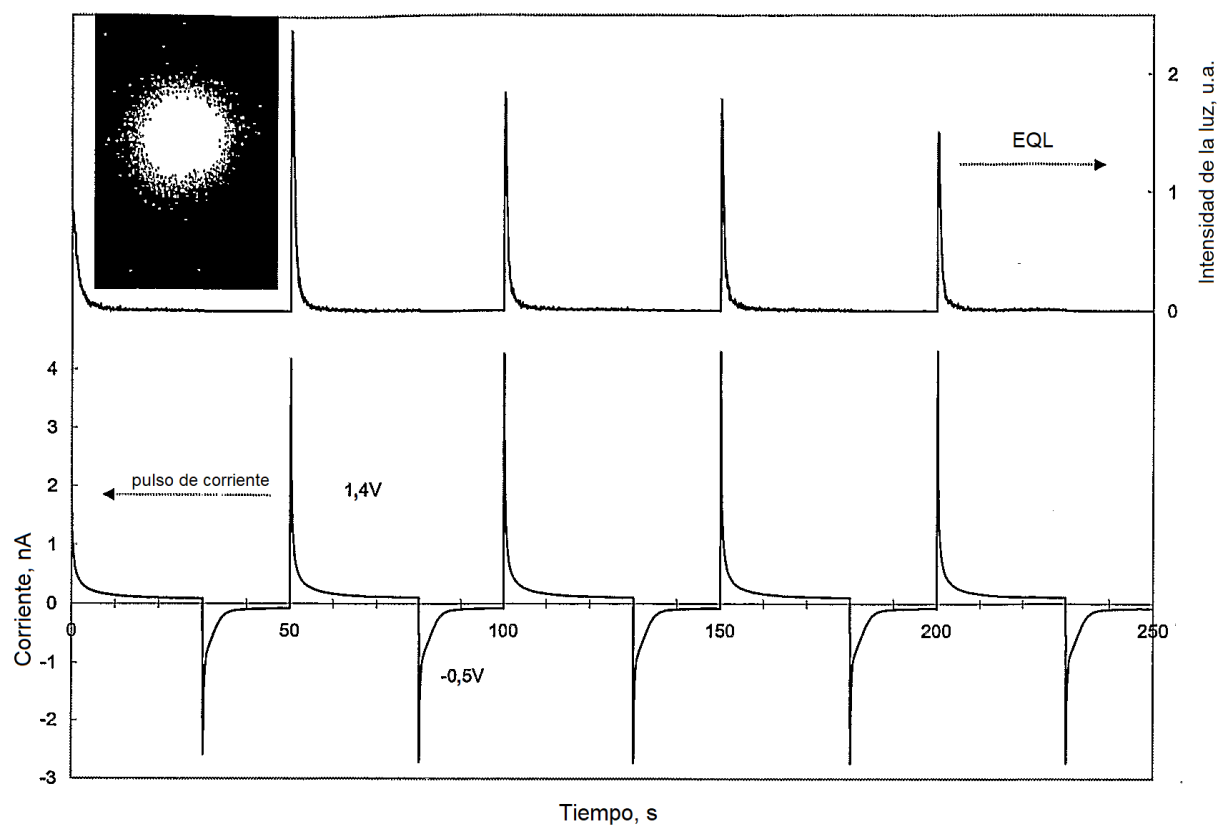


FIGURA 5

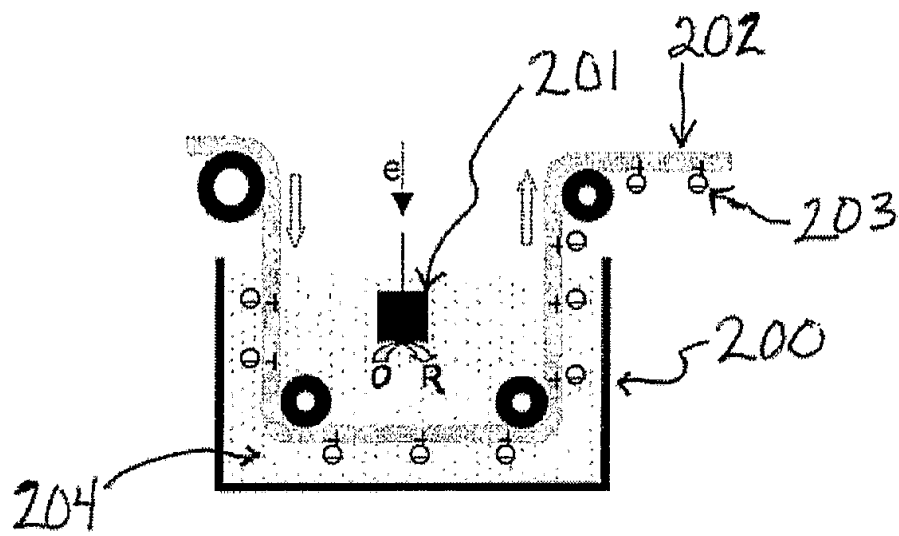


FIGURA 6