

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 470**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/02** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2016 PCT/GB2016/050162**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120606**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2016 E 16701879 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3250911**

54 Título: **Detección de la capacitancia cuántica**

30 Prioridad:

**26.01.2015 GB 201501232**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2019**

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED  
(50.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way, Botley**

**Oxford OX2 0JB, GB y**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO" - UNESP (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DAVIS, JASON y**

**BUENO, PAULO ROBERTO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 731 470 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

Detección de la capacitancia cuántica

- 5 La presente invención se refiere a un método y a un aparato para la detección electroquímica mediante el sondeo de la capacitancia cuántica de un electrodo funcionalizado.

**Antecedentes**

- 10 Las técnicas electroquímicas se han usado en una amplia selección de aplicaciones de detección, por ejemplo, para la detección y cuantificación de moléculas de interés diagnóstico en muestras fisiológicas, para la detección de gases tóxicos y para la monitorización de los cambios en parámetros ambientales tales como la humedad.

- 15 La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica que monitoriza los cambios en la capacitancia o resistencia a la transferencia de carga asociados con los cambios en el entorno local de una superficie de electrodo adecuadamente modificada. Dichos cambios pueden incluir la unión de sustancias (por ejemplo, de una especie diana tal como un biomarcador) a la superficie del electrodo, así como cambios en parámetros ambientales tales como la temperatura. La EIS es una técnica atractiva para detectar aplicaciones en vista, por ejemplo, de la simplicidad de su construcción, de su sensibilidad, selectividad y fácil aplicación dentro de las metodologías exentas de marcadores.

- 20 En un trabajo reciente, los presentes inventores han demostrado que se pueden aplicar métodos de impedancia electroquímica en la resolución de un intervalo de fluctuaciones de carga dentro de películas moleculares confinadas en las superficies de los electrodos. Estos comprenden cambios asociados con la fluctuación electrónica del dipolo y el movimiento iónico inducido por el campo, y se pueden resolver mediante espectroscopia de capacitancia de monocapa electroactiva de acuerdo con sus escalas de tiempo específicas y la dependencia del potencial superficial. Cuando estas películas moleculares contienen una fracción con estados orbitales que son energéticamente accesibles (activa redox), la transferencia de electrones resultante hacia/desde el electrodo metálico subyacente genera un nuevo proceso de carga, dependiente sensiblemente del potencial, en esta superficie de contacto. Esta capacitancia faradaica (conocida como capacitancia redox,  $C_r$ ) no es electrostática y puede ser (para películas moleculares de alta calidad con velocidades rápidas asociadas de transferencia heterogénea de electrones) cientos de veces mayor que la aportación de Helmholtz. Se ha demostrado que esta  $C_r$  distintiva puede integrarse en películas que, además, son capaces de reclutar dianas de interés específicas (tales como las parejas de antígeno de los anticuerpos). Entonces, es posible usar la capacitancia redox en el establecimiento de un nuevo formato de biodetección exento de marcadores de alta sensibilidad, estabilidad y conveniencia. Para más información, cabe hacer referencia, por ejemplo, al documento PCT/GB2014/051938 y a "Biosensors and Bioelectronics" 50 (2013) 437-440.

Aunque estas técnicas de EIS permiten un método de detección de alta sensibilidad, estable y conveniente, cabe señalar lo siguiente:

- 40 (i) La capacitancia redox,  $C_r$ , en efecto, informa (a través de la capacitancia) de la actividad electroquímica de los grupos redox confinados en su "mitad del potencial de onda" electroquímico óptico.  
 (ii) No se recopila información en ningún otro potencial.  
 (iii) Si se perturba la actividad electroquímica de la película, cambiará el valor medido de  $C_r$ . Las perturbaciones debidas a fenómenos distintos de la unión/el reconocimiento específico (por ejemplo, reacciones secundarias/descomposición, cambios en la penetración de disolventes o electrolitos) no serían necesariamente distinguibles de la unión/reconocimiento objeto de estudio.

- 50 Existe, por tanto, una necesidad de métodos de detección alternativos, pero relacionados, por ejemplo, basados en los principios de EIS. Sería particularmente atractivo un método de detección que use una configuración experimental sencilla (por ejemplo, un solo electrodo de trabajo como sonda), que sea ampliamente aplicable para la detección de un intervalo de diferentes parámetros, que no padezca una o más de las desventajas con los métodos conocidos analizados anteriormente y/o que tenga una alta sensibilidad y/o selectividad a la sustancia química o a otro parámetro que se desee detectar.

- 55 Lehr *et al.* (*Analytical Chemistry* 86(5) 2014 2559-2564) se refiere a un método espectroscópico de capacitancia derivada de la impedancia, en el que se usaron películas moleculares mixtas que comprendían ferroceno y receptores de anticuerpos frente a dos dianas de importancia clínica para informar sobre la fosfatasa ácida prostática humana (PAP) y la proteína C reactiva, respectivamente.

**60 Sumario de la invención**

- Los presentes inventores han identificado ahora un nuevo método para detectar cambios en el entorno local de una superficie del electrodo adecuadamente funcionalizada. El nuevo método puede llevarse a cabo usando un sistema electroquímico particularmente sencillo y conveniente, que incluye un solo electrodo de trabajo (es decir, una sola sonda). Además, no es esencial que el electrodo de trabajo esté funcionalizado con grupos redox, ni que estos grupos redox se supongan estables.

La nueva técnica desarrollada por los inventores es fácilmente aplicable a una amplia selección de aplicaciones de detección, que abarca, por ejemplo, la detección específica de especies diana en un medio portador (por ejemplo, detección de biomarcadores de diagnóstico en muestras fisiológicas), los procedimientos de detección de fármacos, el uso en sistemas de glicomatrices y también la detección de parámetros ambientales tales como la humedad ambiental, la intensidad de la luz y la temperatura en las proximidades del electrodo de trabajo.

Con más detalle, la técnica desarrollada por los inventores hace uso de un electrodo de trabajo que está funcionalizado con elementos de detección que se acoplan electrónicamente al electrodo subyacente. La distribución de los electrones entre los elementos de detección y el electrodo tiene una huella capacitiva (y dinámica de carga) asociada que cambia sensiblemente a medida que va cambiando el entorno local.

En el método de la invención, se obtienen mediciones de impedancia electroquímica en un intervalo de diferentes potenciales aplicados (en lugar del único potencial subyacente que se aplica en un método de EIS convencional). De la pluralidad de mediciones obtenidas a diferentes potenciales, se obtienen mediciones del componente real e/o imaginario de la capacitancia compleja,  $C'$  y/o  $C''$ , en función de la tensión a una frecuencia fija ( $\omega$ ). Se ha encontrado que la integración de los valores medidos de  $C'$  y  $C''$  sobre la tensión da un valor de medición integrado que refleja íntimamente y, por lo tanto, detecta la naturaleza del entorno local del electrodo de trabajo. Específicamente, la presente invención proporciona:

[1] Un método de detección para detectar una sustancia química, comprendiendo el método:

(A) obtener, mediante espectroscopia de impedancia electroquímica realizada en un intervalo de potenciales aplicados, una pluralidad de mediciones de la impedancia compleja,  $Z^*$ , de un sistema que tiene un electrodo de trabajo que está en contacto con un medio portador que puede comprender dicha sustancia, comprendiendo el electrodo de trabajo fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia, en el que el electrodo de trabajo comprende un sustrato de electrodo funcionalizado con elementos de detección, cuya respuesta electroquímica a los potenciales aplicados es sensible a la unión de dicha sustancia a dichas fracciones receptoras, y teniendo los elementos de detección una dimensión de 0,5 a 10 nm;

(B) convertir dicha pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$  a una frecuencia  $\omega$  seleccionada y/o el componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada;

(C) integrar las mediciones de (a)  $C'$ , (b)  $C''$  o (c) cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada para obtener un valor de medición integrado; y

(D) detectar si la sustancia química está presente en el medio portador de dicho valor de medición integrado.

El método de detección de la invención es adecuado para la detección electroquímica mediante el sondeo de la capacitancia cuántica de un electrodo funcionalizado. Por lo tanto, se puede denominar "método de detección de la capacitancia cuántica".

Así pues, la invención también proporciona un método de detección de la capacitancia cuántica que comprende las etapas (A), (B), (C) y (D) como se ha definido anteriormente para el método de detección de la invención.

[2] Un aparato para su uso en el método de detección para detectar una sustancia química, aparato que comprende:

- un espectrómetro electroquímico que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un potencióstato, comprendiendo dicho electrodo de trabajo fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia, en el que dicho electrodo de trabajo comprende un sustrato de electrodo funcionalizado con elementos de detección cuya respuesta electroquímica a los potenciales aplicados es sensible a un cambio en el entorno local del electrodo, teniendo los elementos de detección una dimensión de 0,5 a 10 nm;

- un receptor configurado para recibir, desde dicho espectrómetro electroquímico, datos de entrada que comprenden una pluralidad de mediciones de impedancia compleja,  $Z^*$ , en un intervalo de potenciales aplicados;

- un procesador configurado para (i) convertir dicha pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada y/o el componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada e (ii) integrar dichas mediciones de (a)  $C'$ , (b)  $C''$  o (c) cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada para obtener un valor de medición integrado. El método de detección puede ser un método de detección de la capacitancia cuántica, es decir, el aparato puede ser para su uso en un método de detección de la capacitancia cuántica; y

- una unidad de salida configurada para los datos de salida generados a partir de dicho valor de medición integrado, comprendiendo dichos datos de salida una indicación de la presencia, ausencia o concentración de la sustancia que se ha de detectar.

Otras características y realizaciones preferidas se describen en la descripción adjunta y en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra curvas analíticas construidas a partir de la densidad electrónica y sus variaciones de DOS asociadas, obtenidas como se describe en el Ejemplo 1. El recuadro (b) muestra la variación de  $q=e^2 g(E)$  (obtenida de las mediciones de CS) debida a la interacción entre anti-CRP y CRP en una capa molecular electroactiva a concentraciones variables de CRP (en la figura, se indica la tendencia de concentración de PCR creciente). Las energías absolutas se muestran en el eje x superior. Las líneas son un ajuste de los datos experimentales (representados por puntos) con respecto a la forma esperada de Gauss. El recuadro (a) muestra la relación lineal (curva analítica) entre el logaritmo natural de la concentración de CRP y la densidad de electrones del sistema.

La Figura 2 muestra los cambios de conductancia y una curva analítica asociada, obtenida como se describe en el Ejemplo 1. El recuadro (a) muestra las mediciones de la conductividad debida a una variación en la densidad de electrones a diversas concentraciones de CRP (en la figura, se indica la tendencia de concentración de CRP creciente). El recuadro (b) muestra una curva analítica obtenida de la variación de la conductancia de electrones en la capa debida a la interacción entre anti-CRP y CRP.

La Figura 3 es una representación esquemática de un electrodo de trabajo (oro) funcionalizado con elementos de detección que están acoplados electrónicamente al electrodo subyacente. En este ejemplo, se monta una lámina de grafeno en el electrodo, y se une al grafeno una proteína que sirve como receptor a un analito diana. La densidad de estados (estados cuánticos), medida experimentalmente mediante espectroscopia de capacitancia, se usó como señal del transductor.

La Figura 4 es un gráfico de la respuesta relativa (RR) expresada como un porcentaje (eje y) para diferentes concentraciones de un analito diana, alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sinc), unidades de pM (eje x). La gráfica muestra respuestas analíticas comparativas en una capa de grafeno conductora dispuesta en una capa aislante sobre el sustrato de oro. La capa de grafeno se modificó adecuadamente con anti- $\alpha$ -sinc, para la detección de  $\alpha$ -sinc. Es evidente que tanto la capacitancia cuántica como la conductancia cuántica es más sensible que la energía de la superficie (como se indica en la Ec. 1 en el Ejemplo 2). La sensibilidad es evidenciada por la pendiente de los ensayos (S). Las frecuencias analíticas óptimas para el parámetro de capacitancia y resistencia son de 118 y 22 Hz, respectivamente. La desviación típica se calcula a través de tres mediciones para cada concentración dada con todos los  $r^2 > 0,99$ .

**30 Descripción detallada**

Se describen ahora las características de la presente invención.

**35 Método de detección**

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica conocida por el experto en la materia. En general, se aplica un potencial de ca variable en un potencial de polarización (o CC) entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. En general, el EIS implica explorar en un intervalo de frecuencias  $\omega$  de CA. La relación entre la señal de entrada (normalmente, el potencial variable) y la señal de salida (normalmente, la corriente variable) permite calcular la impedancia. En general, existe una diferencia de fase entre la señal de entrada y la señal de salida, de modo que la impedancia puede considerarse como una función compleja  $Z^*$ , que tiene una parte real (a veces denominada  $Z'$ ) y una parte imaginaria (a veces denominada  $Z''$ ).

El intervalo de frecuencias del potencial de CA variable aplicado puede ser de 1 mHz a 10 MHz. La amplitud del potencial de CA aplicado, que normalmente está en forma de onda sinusoidal, puede ser de 1 mV a 100 mV, opcionalmente, de 5 mV a 50 mV, opcionalmente, de 5 mV a 20 mV, opcionalmente, de 5 mV a 15 mV, opcionalmente, de 8 mV a 12 mV, opcionalmente, aproximadamente 10 mV.

Al realizar una medición de EIS, El potencial de polarización (o potencial de corriente continua) puede ajustarse a cualquier valor deseado. Este potencial de CC o potencial de polarización se conoce en el presente documento como el potencial aplicado. El método de la presente invención implica obtener una pluralidad de mediciones de la impedancia compleja en un intervalo de potenciales aplicados (lo que permite la posterior integración sobre la tensión aplicada), es decir, se obtiene una serie de mediciones de EIS cada una a diferentes tensiones seleccionadas. Por lo general, la pluralidad de mediciones de la impedancia compleja obtenida por EIS es de al menos tres mediciones, Preferentemente, de al menos cinco mediciones, tal como de al menos diez o incluso al menos veinte mediciones, es decir, el intervalo de potenciales aplicados normalmente comprende al menos tres potenciales aplicados diferentes, preferentemente, al menos cinco potenciales aplicados diferentes, tales como al menos diez o incluso al menos veinte potenciales aplicados diferentes.

En la etapa de convertir la pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$ , se usan mediciones de  $C'$  a una frecuencia  $\omega$  seleccionada (fija/única). Como un experto en la materia sabría,  $C'$  normalmente varía a medida que cambia  $\omega$  (es decir,  $C'$  es una función de  $\omega$ ). La frecuencia  $\omega$  seleccionada apropiada dependerá, por supuesto, de la construcción de un electrodo particular y de la naturaleza del método de detección que se está realizando. Sin embargo, la determinación de una frecuencia  $\omega$  seleccionada adecuada es la habitual. El experto en la materia podría fácilmente, por ejemplo, identificar un valor de  $\omega$  en el que los valores obtenidos de  $C'$  fueran satisfactoriamente altos (por ejemplo, en o cerca del valor máximo de  $C'$  en todo el

intervalo de frecuencias aplicado en una exploración de EIS de rutina). Se aplican principios análogos cuando la pluralidad de mediciones de  $Z^*$  se convierte en una pluralidad de mediciones del componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$ .

- 5 La conversión de  $Z^*$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en  $C'$  /o  $C''$  es la habitual y se conoce bien en la técnica. En particular, en un análisis de EIS práctico convencional, la función de impedancia compleja  $Z^*(\omega)$  a un determinado potencial se puede convertir fasorialmente en capacitancia compleja  $C^*(\omega)$  con sus componentes real e imaginario, usando la ecuación  $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$ .
- 10 La integración de las mediciones de  $C'$  y/o  $C''$  en función de la tensión aplicada también se puede realizar de forma habitual, por ejemplo, usando "métodos del área bajo la gráfica" cuando  $C'$ ,  $C''$  o cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$  se representa frente a la tensión aplicada y/o por medio de algoritmos informatizados bien conocidos y habituales para integrar datos derivados empíricamente.
- 15 Se ha encontrado que la integración de cualquiera de  $C'$  y  $C''$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada proporciona un "valor de medición integrado" que es adecuado para la detección, es decir, que se puede usar para informar sobre la unión de la sustancia a las fracciones receptoras cuando se realizaron las mediciones de EIS. Específicamente, un valor de medición integrado derivado de la integración de  $C'$  está relacionado con la densidad de estados (DOS) del sistema, es decir, refleja la capacitancia cuántica (como se ilustra en la Figura 1 del Ejemplo 1). Un valor de medición integrado derivado de la integración de  $C''$  está relacionado con la conductancia del sistema (como se ilustra en la Figura 2 del Ejemplo 1).

25 En la práctica, a veces, se puede preferir (por simplicidad pura de la operación) obtener el valor de medición integrado mediante la integración de solo uno de  $C'$  y  $C''$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada. En una primera realización preferida, por lo tanto, la pluralidad de mediciones de  $Z^*$  se convierte en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada y estas mediciones se convierten en función de la tensión aplicada para obtenerse un valor de medición integrado. Además, en una segunda realización preferida, la pluralidad de mediciones de  $Z^*$  se convierte en una pluralidad de mediciones del componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada y estas mediciones se convierten en función de la tensión aplicada para obtenerse el valor de medición integrado.

30 Sin embargo, dado que se pueden usar tanto  $C'$  como  $C''$ , también será evidente para el experto que es posible obtenerse un valor de medición integrado integrando cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada. Por ejemplo, se puede usar cualquier suma de los valores de  $C'$  y  $C''$  (donde  $C'$  y/o  $C''$  están posiblemente ponderados con cualquier constante negativa o positiva) o cualquier múltiplo o cociente de los valores de  $C'$  y  $C''$ .

40 Por lo tanto, se ha de entender que la expresión "método de detección de la capacitancia cuántica", tal como se usa en el presente documento, engloba métodos en los que el valor de medición integrado se obtiene mediante la integración de solo  $C''$  a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada, de modo que el valor de medición integrado refleje la conductancia del sistema en lugar de la capacitancia cuántica, así como los métodos en los que el valor de medición integrado se obtiene mediante la integración de solo  $C'$  o la integración de cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$  como se ha explicado anteriormente.

45 La etapa de detectar si la sustancia química está presente en el medio portador, es decir, la unión de la sustancia a las fracciones receptoras, normalmente se realiza comparando el valor de medición integrado con uno o más valores de referencia. El/los valor/es de referencia pueden obtenerse mediante la obtención de uno o más valores de medición integrados correspondientes en condiciones en las que ya se conoce la unión de la sustancia a las fracciones receptoras. En otras palabras, el/los valor/es de referencia se usan para calibrar el valor de medición integrado obtenido cuando el método se realiza en condiciones de ensayo con valores esperados que se obtendrían en condiciones conocidas específicas. La detección, es decir, la unión de la sustancia a las fracciones receptoras, puede ser de naturaleza cualitativa o cuantitativa. La calibración de un aparato para su uso en aplicaciones de detección es bien conocida y habitual en la técnica, incluso en métodos que se basan en la EIS.

## 55 **Construcción de electrodos de trabajo**

El electrodo de trabajo comprende un sustrato de electrodo funcionalizado con elementos de detección.

60 El sustrato del electrodo puede comprender cualquier material eléctricamente conductor. El sustrato puede comprender un metal o carbono. El metal puede ser un metal en forma elemental o una aleación de un metal. Opcionalmente, la totalidad del sustrato comprende un metal o carbono. El sustrato puede comprender un metal de transición. El sustrato puede comprender un metal de transición seleccionado entre cualquiera de los grupos 9 a 11 de la Tabla Periódica. El sustrato puede comprender un metal seleccionado entre, pero sin limitación, renio, iridio, paladio, platino, cobre, indio, rubidio, plata y oro. El sustrato puede comprender un metal seleccionado entre oro, plata y platino. El sustrato puede comprender un material que contenga carbono, que puede seleccionarse entre grafito pirolítico en plano de borde, grafito pirolítico en plano basal, carbón vítreo, diamante dopado con boro, grafito pirolítico

altamente ordenado, polvo de carbono y los nanotubos de carbono. En una realización preferida, el sustrato comprende oro, por ejemplo, el sustrato es un sustrato de oro.

5 La superficie del electrodo (es decir, la superficie del sustrato) puede ser plana, que incluye una superficie básicamente plana, por ejemplo, sin hendiduras, protuberancias y poros. Dichas superficies de sustrato pueden prepararse fácilmente mediante técnicas tales como pulido con partículas finas, por ejemplo, pulverización con partículas finas, opcionalmente, en una secuencia de etapas en la que el tamaño de las partículas finas disminuye en cada etapa de pulido. Las partículas finas pueden comprender, por ejemplo, un material a base de carbono, tal como diamante, y/o puede tener partículas con diámetros de 10  $\mu\text{m}$  o inferiores, opcionalmente, de 5  $\mu\text{m}$  o inferiores, opcionalmente, de 10 3  $\mu\text{m}$  o inferiores, opcionalmente, de 1  $\mu\text{m}$  o inferiores, opcionalmente, de 0,5  $\mu\text{m}$  o inferiores, opcionalmente, de 0,1  $\mu\text{m}$  o inferiores. Después del pulido, la superficie del sustrato puede lavarse, por ejemplo, por ultrasonidos, opcionalmente, en un medio líquido adecuado, tal como agua, por ejemplo, durante un período de al menos 1 minuto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos. Opcionalmente, la superficie del sustrato puede lavarse con un abrasivo, por ejemplo, ácido, solución, por ejemplo después del pulido y, si se usan, etapas de lavado ultrasónico. 15 La solución abrasiva puede comprender un ácido inorgánico, por ejemplo,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y/o un peróxido, por ejemplo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en un medio líquido adecuado, por ejemplo, agua. Opcionalmente, los sustratos pueden ser pulidos electroquímicamente, que pueden seguir cualquier etapa que implique uno o más de entre pulir con partículas finas, lavar, por ejemplo, con ultrasonidos, y/o usar una solución abrasiva. El pulido electroquímico puede implicar un ciclo entre un potencial superior e inferior hasta que se alcance un máximo de reducción estable, por ejemplo, un potencial superior de 0,5 V o mayor, opcionalmente, de 1 V o mayor, opcionalmente, 1,25 V o mayor, y un potencial inferior, de 20 0,5 V o inferior, opcionalmente, 0,25 V o inferior, opcionalmente, 0,1 V o inferior.

El sustrato de electrodo está funcionalizado con elementos de detección. Los elementos de detección están confinados en la superficie del electrodo. En combinación con el sustrato del electrodo, los elementos de detección son capaces de generar una respuesta electroquímica cuando se realiza la EIS. Además, la respuesta electroquímica a los 25 potenciales aplicados es sensible a la unión de la sustancia a las fracciones receptoras.

Estas características del electrodo pueden lograrse garantizando que los elementos de detección estén acoplados electrónicamente a la superficie del electrodo. Por "acoplados electrónicamente" se entiende que los electrones son capaces de redistribuirse entre la superficie del electrodo y los elementos de detección. Por lo tanto, cuando el electrodo se produce funcionalizando la superficie del electrodo con los elementos de detección, se produce una redistribución de los electrones entre la superficie del electrodo y los elementos de detección. Asimismo, se produce la redistribución de elecciones entre la superficie del electrodo y los elementos de detección cuando hay un cambio en el entorno local del electrodo, en concreto, un cambio correspondiente al sustrato que se vaya a detectar. 30

En general, el elemento de detección puede estar constituido por cualquier compuesto químico con un potencial químico diferente de electrones al del electrodo. El electrodo y el compuesto químico dado deben estar separados una distancia muy corta, es decir, en una nanoescala, tal como inferior a 10 nm, por ejemplo, inferior entonces a 2 nm. Esta corta distancia determina la naturaleza cuantificada de la señal de transducción. De hecho, conecta dos estados energéticos (los de la sonda de electrodo y otro del propio compuesto químico) por medio de una región de dispersión en la longitud nanométrica. 35

Por consiguiente, cada uno de los elementos de detección normalmente tiene una dimensión de 10 nm o inferior, tal como de 0,5 a 10 nm, preferentemente, de 1 a 5 nm, por ejemplo, de 1 a 3 nm. Dicha dimensión normalmente es la dimensión mayor, que se extiende como una línea recta desde un extremo del elemento de detección que está unido a la superficie del electrodo hasta un extremo del elemento de detección que no está unido a la superficie del electrodo. Por lo general, todas las dimensiones (es decir, todas las dimensiones medibles) de cada uno de los elementos de detección son de 10 nm o inferiores, tal como de 0,5 a 10 nm, preferentemente, de 1 a 5 nm, por ejemplo, de 1 a 3 nm. 45

Un elemento de detección puede consistir en un compuesto químico con un potencial químico de electrones diferente al del electrodo que está acoplado a la superficie del electrodo a través de un enlace químico corto, siempre que el elemento de detección (es decir, dicho compuesto químico y dicho enlazador) tenga una dimensión superior a 10 nm o inferior, tal como de 0,5 a 10 nm, preferentemente, de 1 a 5 nm, por ejemplo, de 1 a 3 nm. 50

Por lo general, los elementos de detección tienen una densidad de estados electrónicos ("DOS") finita y limitada, en contraste con el sustrato de electrodo subyacente, que puede considerarse que tiene una DOS esencialmente infinita. Por lo tanto, los elementos de detección normalmente son diferentes del sustrato del electrodo, es decir, no son un metal conductor o sustrato de carbono. Los ejemplos de los elementos de detección adecuados incluyen especies activas rédox, una película molecular, nanopartículas, grafeno, nanotubos de carbono y puntos cuánticos. La funcionalización de sustratos de electrodo con dichos materiales es bien conocida en la técnica y se puede lograr usando técnicas de rutina. 55 60

Los ejemplos representativos de especies activas rédox adecuadas incluyen sistemas rédox basados en osmio, ferrocenos, quinonas y porfirinas, incluyendo sus derivados. Los derivados de la quinina incluyen *p*-benzoquinona e hidroquinona. Preferentemente, la especie activa rédox es ferroceno o un derivado del mismo, por ejemplo, un derivado de alquilo (por ejemplo, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ) o de acilo del mismo. Lo más preferentemente, la especie activa rédox es 65

ferroceno.

De manera importante, aunque los elementos de detección pueden comprender especies activas rédox, no es esencial que los elementos de detección sean activos rédox. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el electrodo de trabajo está funcionalizado con elementos de detección, pero el electrodo de trabajo no está funcionalizado con ninguna especie activa rédox. Por ejemplo, los elementos de detección en dicha realización pueden seleccionarse entre una película molecular, nanopartículas, grafeno, nanotubos de carbono y puntos cuánticos. Por ejemplo, los elementos de detección no comprenden especies activas rédox.

En una realización preferida, los elementos de detección comprenden grafeno. A menudo, por ejemplo, el sustrato de electrodo comprende oro (por ejemplo, el sustrato puede ser un sustrato de oro) y los elementos de detección comprenden grafeno. El grafeno puede estar presente en forma oxidada, es decir, como óxido de grafeno.

El electrodo de trabajo puede comprender además una capa intermedia dispuesta entre el sustrato de electrodo y los elementos de detección. La capa intermedia puede ser una monocapa autoensamblada de un determinado compuesto, por ejemplo, cisteína. El compuesto en cuestión se puede denominar aislante.

En una realización, el sustrato de electrodo comprende oro, el electrodo de trabajo comprende además una capa intermedia dispuesta sobre el sustrato del electrodo, y los elementos de detección, que están dispuestos en la capa intermedia, comprenden grafeno. El grafeno puede estar presente en forma oxidada, es decir, como óxido de grafeno. La capa intermedia normalmente comprende cisteína.

La expresión "elementos de detección" se puede usar indistintamente con la expresión "entidades a nanoescala", que también describe la naturaleza del material funcionalizado en la superficie del electrodo.

25

#### **Aplicaciones del método de detección**

Es posible detectar esencialmente cualquier sustancia siempre que un cambio en la cantidad de esa sustancia produzca un cambio en el entorno local del electrodo de trabajo y, por lo tanto, un cambio en la distribución de electrones entre los elementos de detección y el sustrato de electrodo. El electrodo de trabajo se puede diseñar, por tanto, con respecto al método de detección que se prevea usar. En la presente invención, sin embargo, es específicamente una sustancia química que se detecta y, por lo tanto, como se explica más adelante, el cambio en el entorno local del electrodo de trabajo corresponde a la unión de la sustancia a las fracciones receptoras.

#### *Detección de sustancias físicas*

En la presente invención, el método es un método para detectar una sustancia química, es decir, un compuesto químico o un grupo de compuestos químicos. En la etapa (A), el electrodo de trabajo está en contacto con un medio portador que puede comprender la sustancia, y la respuesta electroquímica de los elementos de detección a los potenciales aplicados es sensible a la presencia de dicha sustancia. Si el medio portador contiene la sustancia, entonces se obtendrá un determinado valor de medición integrado. El valor de medición integrado será diferente si el medio portador no contiene la sustancia. Asimismo, los cambios en el valor de medición integrado ocurrirán a medida que cambia la concentración de la sustancia en el medio portador.

El medio portador está preferentemente en forma líquida, aunque también son posibles medios gaseosos. El líquido portador (o gas) puede ser cualquier líquido (o gas) en el que la sustancia se pueda suspender o disolver (o dispersar). En una realización, el líquido portador comprende agua. En una realización, el líquido portador comprende un fluido biológico. Un fluido biológico puede ser un fluido que se ha obtenido de un sujeto, que puede ser un ser humano o un animal. En una realización, el líquido portador comprende un fluido biológico no diluido. Un fluido biológico no diluido en el presente contexto es un fluido biológico obtenido de un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal, que no ha sido diluido con otro líquido. El fluido biológico puede seleccionarse de sangre, orina, lágrimas, saliva, sudor y líquido cefalorraquídeo. Opcionalmente, el medio portador comprende un fluido biológico obtenido de un sujeto, por ejemplo, un ser humano o un animal, y un diluyente. El diluyente puede añadirse al fluido biológico después de haber sido obtenido del sujeto. El diluyente puede incluir un medio líquido, por ejemplo, un medio líquido seleccionado de agua y un alcohol, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, etanol. El medio portador puede comprender además un tampón. El tampón puede comprender un fosfato.

El electrodo de trabajo comprende fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia y la respuesta electroquímica de los elementos de detección a los potenciales aplicados es sensible a la unión de dicha sustancia a las fracciones receptoras. Preferentemente, las fracciones receptoras son capaces de unirse específicamente a la sustancia. "Capaz de unirse específicamente a la sustancia" normalmente significa que tiene una constante de unión a la sustancia al menos 50 veces mayor que la constante de unión a cualquier otra/s sustancia/s presente/s en el medio portador, preferentemente, al menos 100 veces mayor y más preferentemente todavía al menos 200 veces mayor.

65

El sustrato de electrodo está funcionalizada tanto con elementos de detección como con fracciones receptoras que

son diferentes de los elementos de detección.

Los ejemplos de fracciones receptoras incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, oligosacáridos, péptidos y proteínas. Preferentemente, las fracciones receptoras se seleccionan de anticuerpos, ácidos nucleicos y péptidos. Lo más preferentemente, las fracciones receptoras son anticuerpos.

El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo pueden seleccionarse de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es del tipo IgG. El anticuerpo se une selectivamente a la sustancia de interés. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede derivarse de un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un mamífero seleccionado de un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, una cabra, una oveja y un caballo. El aptámero se puede seleccionar entre un aptámero de péptido, un aptámero de ADN y un aptámero de ARN.

El anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpo anti-sinucleína alfa (anti- $\alpha$ -sinc).

De manera clara, la elección de las fracciones receptoras para un electrodo dado está determinada por la identidad de la sustancia de interés, es decir, la "diana" de interés.

Por ejemplo, la diana puede ser sinucleína alfa ( $\alpha$ -sinc), en cuyo caso las fracciones receptoras normalmente comprenden o consisten en anti- $\alpha$ -sinc.

En una realización, el electrodo de trabajo comprende fracciones receptoras; los elementos de detección comprenden grafeno; y el sustrato del electrodo comprende oro. Las fracciones receptoras pueden ser como se han definido anteriormente, por ejemplo, pueden comprender o consistir en anti- $\alpha$ -sinc. El grafeno puede estar presente en forma oxidada, es decir, como óxido de grafeno, ya que esto puede facilitar la unión de las fracciones receptoras.

El electrodo de trabajo puede comprender además una capa intermedia dispuesta sobre el sustrato del electrodo, entre el sustrato del electrodo y los elementos de detección. La capa intermedia normalmente comprende cisteína.

*Detección de una especie diana, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico*

La sustancia puede ser una especie diana, es decir, una especie que puede o no estar presente en el medio portador, opcionalmente, junto con una o más otras especies no diana, y que los usuarios desean detectar. Más normalmente, el método es uno para determinar la concentración de dicha especie diana en dicho medio portador.

Aunque este método se puede usar para detectar una selección de especies diana, un aspecto particularmente útil es la detección de una especie de interés diagnóstico. La detección sensible de biomarcadores en muestras fisiológicas tiene un interés cada vez mayor en el diagnóstico. Los métodos de la presente invención se pueden usar para detectar (y determinar la concentración) de biomarcadores específicos de manera sensible y selectiva, específicamente al proporcionar un sustrato de electrodo que esté funcionalizado con fracciones receptoras que sean capaces de unirse específicamente al biomarcador de interés.

Los ejemplos de especies diana incluyen aquellas seleccionadas del grupo que consiste en proteína CRP, insulina y un marcador de uno o más de entre neurodegeneración, cáncer, infarto de miocardio, diabetes y traumatismo general.

Más en general, las especies diana adecuadas para la detección de acuerdo con los métodos de la invención incluyen proteínas, polipéptidos, anticuerpos, nanopartículas, fármacos, toxinas, gases nocivos, sustancias químicas peligrosas, explosivos, partículas víricas, células, organismos multicelulares, citocinas y quimiocinas, ganietocitos, orgánulos, lípidos, secuencias de ácido nucleico, oligosacáridos, intermedios químicos de las rutas metabólicas y macromoléculas. En las realizaciones preferidas, la especie diana comprende, consiste esencialmente en o consiste en, una molécula biológica, más adecuadamente una macromolécula biológica, mucho más adecuadamente un polipéptido. Un biomarcador es un ejemplo de una molécula biológica de interés particular.

Si la especie diana es o comprende una proteína, la proteína puede seleccionarse de, aunque sin limitación, proteínas nativas, proteínas desnaturalizadas, fragmentos de proteína, y proteínas expresadas procariota o eucarióticamente. La proteína puede tener su significado normal en la técnica, y lo más preferentemente "proteína" se refiere a una molécula polipeptídica. Dicho polipéptido puede comprender modificaciones tales como glicosilación; fosforilación u otras modificaciones de este tipo.

Si la especie diana es un anticuerpo, el anticuerpo puede seleccionarse de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Si la especie diana es una nanopartícula, la nanopartícula puede seleccionarse de, aunque sin limitación, una o más de nanopartículas aislantes, metálicas o semiconductoras.

Si la especie diana es un fármaco, el fármaco puede seleccionarse de, aunque sin limitación, alcohol (por ejemplo,



etanol), anfetaminas, nitrato de amilo, heroína, ketamina, esteroides anabólicos, LSD, disolventes, cannabis, cocaína (tal como clorhidrato de cocaína o "coca"), tabaco, tranquilizantes, crack (es decir, base libre de cocaína), éxtasis y/o gammahidroxibutirato (GHB). Como alternativa, en algunas realizaciones, el fármaco puede ser una sustancia medicinal.

5 La especie diana puede ser un fármaco candidato, por ejemplo, una entidad química o biológica que puede ser ensayada o cribada para una actividad o propiedad particular usando la presente invención.

10 Si la especie diana es una toxina, la toxina puede seleccionarse de, aunque sin limitación, una o más toxinas procedentes de animales, plantas o bacterias.

Si la especie diana es una partícula vírica, la partícula vírica puede seleccionarse de, aunque sin limitación, una o más partículas víricas con y sin un genoma.

15 Si la especie diana es una célula, la célula puede seleccionarse de, aunque sin limitación, una o más células progenitoras pluripotentes, células humanas (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, mastocitos, fagocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales), células cancerosas (por ejemplo, las que provienen de cánceres de hígado, óseo cervical, pancreático, colorrectal, de próstata, epidérmico, de cerebro, de mama, de pulmón, testicular, renal, de vejiga), organismos unicelulares de origen no humano, algas, hongos, bacterias, células vegetales, huevos de parásitos, plasmodios y micoplasmas.

20 Si la especie diana es un orgánulo, el orgánulo puede seleccionarse de, aunque sin limitación, uno o más de núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, lisosoma, fagosoma, membranas intracelulares, membranas extracelulares, citoesqueleto, membrana nuclear, cromatina, matriz nuclear y cloroplastos.

25 Si la especie diana es un lípido, el lípido puede seleccionarse de, aunque sin limitación, uno o más de lípidos de señalización, lípidos estructurales, fosfolípidos, glicolípidos y ácidos grasos.

30 Si la especie diana es una secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico puede seleccionarse de, aunque sin limitación, uno o más de ADN, ADNc, ARN, ARNr, ARNm, miARN y ARNT.

Si la especie diana es un oligosacárido, el oligosacárido se puede seleccionar, aunque sin limitación, uno o más de oligosacáridos de origen humano, animal, planta, fúngico o bacteriano.

35 La especie diana puede ser cualquier antígeno o analito que sea indicativo de una determinada enfermedad. La diana puede seleccionarse de, por ejemplo, proteína C reactiva (proteína CRP), enzima convertidora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1; adiponectina; receptor específico del producto final de glucosilación avanzada; alfa-2-HS-glicoproteína; angiogenina, ribonucleasa, familia A de RNasa, 5; apolipoproteína A-1; apolipoproteína B (incluyendo antígeno Ag(x)); apolipoproteína E; proteína X asociada a BCL2; CLL linfocitos B/linfoma 2; complemento C3; ligando 2 de quimiocina (motivo C-C); CD 14, soluble; CD 40, soluble; cdk5; relacionada con pentraxina; catepsina B; dipeptidil peptidasa IV; factor de crecimiento epidérmico; endoglin; Fas; fibrinógeno; ferritina; hormona del crecimiento 1; alanina aminotransferasa; factor de crecimiento de hepatocitos; haptoglobina; proteína de 70 kDa de choque térmico 1 B; molécula de adhesión intracelular 1; factor de crecimiento insulínico 1 (somatomedina C); receptor de factor de crecimiento insulínico de tipo 1; proteína 1 de unión a factor de crecimiento insulínico; proteína 2 de unión a factor de crecimiento insulínico; proteína 3 de unión a factor de crecimiento insulínico; interleucina 18; receptor de interleucina 2, alfa; receptor de interleucina 2, beta; interleucina 6 (interferón, beta 2); receptor de interleucina 6; transductor de señal de interleucina 6 (gp130, receptor de oncostatina M); interleucina 8; activina A; leptina (homólogo de obesidad, ratón); activador de plasminógeno, tejido; proopiomelanocortina (adrenocorticotropina/beta-lipotropina/hormona estimuladora de alfa-melanocitos/hormona estimuladora de beta-melanocitos/beta-endorfina); proinsulina; resistina; selectina e (molécula de adhesión endotelial 1); selectina P (proteína de membrana granular de 140 kDa, antígeno CD62); inhibidor de serpin peptidasa, clado E (nexina, inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1), miembro 1; quinasa regulada por suero/glucocorticoide; globulina de unión a hormonas sexuales; factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann); inhibidor de metalopeptidasa TIMP 2; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 1 B; molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1); factor de crecimiento endotelial vascular; Factor II, Factor V, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XII, productos de degradación de F/fibrina, complejo de trombina-antitrombina III, fibrinógeno, plasminógeno, protrombina y factor von Willebrand, y similares. Los marcadores útiles para la diabetes incluyen, por ejemplo, proteína C reactiva; glucosa; insulina; TRIG; GPT; HSPA1 B; IGFBP2; LEP; ADIPOQ; CCL2; ENG; HP; IL2RA; SCp; SHBG; y TIMP2. Las especies diana preferidas actualmente incluyen una especie seleccionada del grupo que consiste en proteína CRP, insulina y un marcador de uno o más de entre neurodegeneración, cáncer, infarto de miocardio, diabetes y traumatismo general.

Las especies de diana pueden, por ejemplo, comprender o consistir en la alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sinc). Si la especie diana es o comprende  $\alpha$ -sinc, las fracciones receptoras pueden comprender o consistir en un anticuerpo contra  $\alpha$ -sinc.

65 La especie diana puede ser una diana asociada con el control de la diabetes. En una realización, la diana puede seleccionarse entre glucosa, insulina, receptor alfa de Interleucina 2 (IL2-RA), proteína C reactiva (CRP) y

hemoglobina glicada (HbA1c). Si la especie diana es glucosa, las fracciones receptoras pueden seleccionarse de, por ejemplo, el elemento de reconocimiento molecular del ensayo de GDH-FAD o una proteína de unión a glucosa/galactosa (GGBP) (Scholle, *et al.*, *Mol. Gen. Genet* 208:247-253 (1987)). Si la diana es IL-2RA, las fracciones receptoras pueden comprender o consistir en un anticuerpo monoclonal específico para IL-2RA. Si la especie diana es o comprende una proteína C reactiva, Preferentemente, ésta es proteína C reactiva humana. Si la especie diana es o comprende una proteína C reactiva, las fracciones receptoras pueden comprender o consistir en anti-CRP. Si la especie diana es o comprende insulina, las fracciones receptoras pueden comprender o consistir en un anticuerpo contra la insulina.

#### 10 *Métodos basados en glicomatrices*

Los métodos de la invención también se pueden usar en aplicaciones que incluyen glicomatrices. Una glicomatriz es una matriz en la que cada unidad de matriz comprende fracciones de carbohidratos específicos (que difieren de las fracciones de carbohidratos en las otras unidades de matriz). En el contexto de la presente invención, la matriz comprende una pluralidad de sistemas electroquímicos direccionables por separado, cuyo electrodo de trabajo está funcionalizado con fracciones receptoras que son fracciones de carbohidratos. Por ejemplo, la matriz de fracciones de carbohidratos puede constituir el glicoma o una parte del glicoma de un organismo, tal como un ser humano.

Por lo tanto, en una realización del método de la invención, la sustancia (que está siendo detectada) se selecciona entre una proteína lectina, una glicoenzima y un anticuerpo de unión a carbohidratos, mientras que las fracciones receptoras son fracciones de carbohidratos. Además, en este método de detección, el electrodo de trabajo puede formar parte de una glicomatriz que comprende una pluralidad de electrodos de trabajo, cada uno funcionalizado con diferentes fracciones de carbohidratos. Por lo tanto, el método puede comprender realizar las etapas del método (A)-(D) en cada uno de los electrodos de trabajo comprendidos en la glicomatriz.

#### 25 *Detección/descubrimiento de fármacos*

Otra aplicación de los métodos de la invención pertenece al campo de la detección y del descubrimiento de fármacos. En sistemas conocidos basados en matrices para la detección de fármacos, cada unidad de matriz comprende fracciones receptoras accesibles a las que la unión por un fármaco candidato indicaría *prima facie* que el fármaco candidato puede ser de interés terapéutico. Por ejemplo, existen métodos de detección conocidos que se basan en el modelo de taxol-tubulina. En este modelo, la actividad de interacción del conocido fármaco contra el cáncer taxol con protulina de tubulina se usa como una referencia con la que se comparan nuevos fármacos candidatos.

En particular, en el método de la invención, la sustancia (que se está detectando) puede ser un fármaco candidato y las fracciones receptoras puede ser fracciones que sean capaces de unirse a un fármaco de referencia conocido. Por lo tanto, la detección de la unión del fármaco candidato a las fracciones receptoras se correlacionaría con el fármaco candidato que se comporta de manera análoga al fármaco de referencia conocido (y, por lo tanto, es digno de un estudio adicional). Por el contrario, la falta de unión puede conducir al rechazo del fármaco candidato.

Se apreciará que, en este método de detección, el electrodo de trabajo puede formar parte de una matriz que comprenda una pluralidad de electrodos de trabajo, cada uno funcionalizado con dichas fracciones receptoras, siendo dicha matriz, por lo tanto, adecuada para el uso de la detección simultánea de una pluralidad de fármacos candidatos. Esta configuración de matriz permite la detección de alto rendimiento de muchos fármacos candidatos a la vez.

#### 45 **Aparato**

La presente invención también proporciona un aparato para su uso en un método de detección para detectar una sustancia química, normalmente, un método de detección de la presente invención. Este aparato comprende un espectrómetro electroquímico cuyo electrodo de trabajo está funcionalizado con elementos de detección y que comprende fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia, es decir, un espectrómetro electroquímico que está especialmente adaptado a realizar el método de la presente invención. El electrodo de trabajo es como se describe en el presente documento.

El aparato comprende además (a) un receptor configurado para recibir, desde dicho espectrómetro electroquímico, datos de entrada que comprenden una pluralidad de mediciones de impedancia compleja,  $Z^*$ , en un intervalo de potenciales aplicados; (b) un procesador configurado para (i) convertir dicha pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real y/o imaginario de la capacitancia compleja,  $C'$  y/o  $C''$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada e (ii) integrar dichas mediciones de  $C'$ ,  $C''$  o una combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada para obtener un valor de medición integrado; y (c) una unidad de salida configurada para los datos de salida generados a partir de dicho valor de medición integrado, comprendiendo dichos datos de salida una indicación de la presencia, ausencia o concentración de la sustancia que se ha de detectar.

El receptor y el procesador pueden formar parte de un ordenador. La funcionalidad del receptor y del procesador se puede lograr programando el ordenador para recibir datos de entrada del método de la invención y procesar estos datos en un valor de medición integrado como se describe en el presente documento.

El receptor puede recibir los datos de entrada ya sea directamente desde el espectrómetro, o indirectamente, por ejemplo, mediante la lectura de los datos de un archivo de datos creado por el espectrómetro.

5 Por "programación" se entiende que el ordenador está dotado de un código legible por ordenador que proporciona instrucciones para llevar a cabo las etapas de recibir los datos de entrada, convertirlos en partes real y/o imaginaria de capacitancia compleja,  $C'$  y/o  $C''$ , e integrarlos para obtener un valor de medición integrado de manera automática, por ejemplo, sin la intervención de un usuario. El ordenador puede comprender, por ejemplo, un ordenador físico que está programado con un programa informático adecuado. Ese programa podría, por ejemplo, proporcionarse en un medio de almacenamiento para ser implementado por el ordenador o una red de ordenadores. El medio de almacenamiento podría ser una parte integral del propio ordenador, tal como un disco duro o un medio de almacenamiento extraíble tal como un disco óptico o dispositivo de almacenamiento portátil tal como un dispositivo de memoria flash USB.

15 El aparato se usa para llevar a cabo un método de la presente invención, mediante el que un operador realiza las mediciones de EIS necesarios de la etapa (A) del método de la invención usando el espectrómetro electroquímico y en el que las etapas posteriores se realizaron entonces automáticamente para completar el método de detección.

20 El ordenador está programado además para generar datos de salida a partir de dicho valor de medición integrado. Dicha salida de datos puede dirigirse a una pantalla y/o a un archivo informático y/o como un flujo de datos a otro dispositivo. Dichos datos pueden comprender datos numéricos sencillos correspondientes al propio valor de medición integrado. Como alternativa, los datos pueden comprender una indicación de la presencia, ausencia o concentración de una sustancia que se está detectando, o una indicación cualitativa o cuantitativa de un parámetro ambiental detectado en el sistema en estudio. Como será evidente para el experto en la materia, el ordenador puede programarse de manera rutinaria para proporcionar dichos datos mediante su programación adicional con valores de calibración (referencia) relacionados con el valor de medición integrado.

### Ejemplo 1

30 Se preparó un electrodo de trabajo de la siguiente manera. Se generaron monocapas mixtas autoensambladas (SAM) en un sustrato de electrodo de oro mediante incubación en una solución de pentadecanotiol y 11-ferrocenilundecanotiol. Se prepararon superficies receptivas mediante la inmersión de estas en Anti-CRP.

35 Se añadieron alícuotas de proteína C reactiva (CRP) a la superficie de contacto con concentraciones que variaban de 0 nmol/l a 8,0 nmol/l en PBS (en concreto, se tomaron mediciones a concentraciones de 0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 nmol/l). Las mediciones electroquímicas se realizaron con un potenciostato usando una configuración de tres electrodos con Ag/AgCl como referencia, platino como contador y el electrodo de trabajo anterior. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y los valores de medición presentados en las figuras son valores medios correspondientemente promediados.

40 Las mediciones de espectroscopia de impedancia electroquímica se realizaron en un intervalo de potenciales de entre +0,2 V y +0,8 V frente a Ag/AgCl con una etapa de potencial de 15 mV y una frecuencia constante de 20 mHz.

45 Así se obtuvieron las DOS de las Figuras 1 y 2. Las formas de la Figura 1(b) se construyeron directamente desde la parte real de la capacitancia compleja a 20 mHz. En concreto, la forma de la DOS refleja la forma de la capacitancia cuántica, es decir,  $e^2$ DOS. Las líneas son un ajuste de los datos experimentales (representados por los puntos en este caso) a una distribución de Gauss que incorpora los efectos de la ampliación térmica. Por lo tanto, la densidad de electrones,  $N$ , (con ampliación térmica) viene dada por la integral de esta distribución de Gauss como

$$N = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{g_r(\mu_e)}{1 + \exp\left[\frac{E_r - \mu_e}{k_B T}\right]} d\mu_e$$

50 en la que:  $g_r(\mu_e)$  es la función de DOS (distribución de Gauss en función del potencial como se muestra en la Figura 1b),  $E_r$  es el potencial rédox de las especies rédox asociadas con el electrodo,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\mu_e$  es el potencial químico de los electrones en el electrodo, relacionado con el potencial como  $\mu_e = -eV$ .

55  $N$  se contabilizó entonces como una función de la concentración de CRP, como se muestra en la Figura 1(a). Específicamente, la densidad electrónica se calculó mediante la integración de las curvas en la Figura 1(b) normalizada por el volumen de la capa molecular ( se usó una longitud de 3,5 nm para la capa molecular de 11-ferrocenilundecanotiol).

60 La Figura 2 se construyó a partir de la expresión de capacitancia imaginaria de la capacitancia compleja a 20 mHz; esto representa la conductancia de la película rédox (véase la Figura 2(a)). La integral de la conductancia también proporciona una densidad electrónica. Esta densidad electrónica también proporciona un medio para detectar uniones

en la película molecular (véase la curva analítica que se muestra en la Figura 2(b)).

## Ejemplo 2

5 Los inventores han demostrado que, mediante el uso de la metodología de espectroscopia de capacitancia, es posible acceder experimentalmente a estados cuantificados moleculares y a su ocupación (capacitancia cuántica) y utilizar esta señal como un transductor para aplicaciones de biodetección; esto se puede hacer porque la capacitancia medida es muy sensible a cualquier cambio (electrostático o químico) del medio ambiente. Además, los inventores han demostrado que tanto la capacitancia cuántica del sistema como la resistencia cuantificada, que comunican los  
10 estados accesibles moleculares cuánticos con el electrodo/la sonda, pueden usarse como señales de transductor. Los inventores también se han dado cuenta de que, de acuerdo con la teoría funcional de la densidad (metodología de la mecánica cuántica), la función de la densidad electrónica,  $E[\rho(\bar{\mu})]$ , está estrechamente relacionada con la espectroscopia de capacitancia de la siguiente manera

$$15 \quad E[\rho(\bar{\mu})] = \frac{\beta}{C_{eq}(\bar{\mu})} = \frac{\gamma}{C_q(\bar{\mu})} + \frac{\gamma'}{C_e(\bar{\mu})} \quad (1)$$

en la que  $C_{eq}$  es la capacitancia electroquímica que contiene dos contribuciones  $C_q(\bar{\mu})$  (cuántica) y  $C_e(\bar{\mu})$  (electrostática). De ello, se deduce que cualquier dispositivo miniaturizado que contenga estados electrónicos restringidos o dimensiones a nanoescala conectadas a un electrodo puede usarse potencialmente en un formato sensorial, siempre que los estados mecánicos cuánticos contenidos en  $\gamma/C_q(\bar{\mu})$  cambien con algún evento externo (unión de una proteína, por ejemplo). Los inventores demuestran en el presente documento, en el caso de una lámina de grafeno montada sobre una sonda de electrodo de trabajo, que el sistema puede ser muy sensible a dichos cambios cuando una proteína unida al mismo sirve como receptor de un analito (proteína diana) como se ilustra en Figura 3. En este sistema, la energía de los estados mecánicos cuánticos, la capacitancia y la resistencia (asociada con el acoplamiento entre los estados electrónicos de grafeno y los del electrodo de oro/sonda) se pueden usar como señales de transductor. Esto se ilustra en la Figura 4.  
20  
25

Los dispositivos se fabricaron mediante la deposición de óxido de grafeno en el electrodo de oro (pulido mecánica y electroquímicamente) a través de una monocapa intermedia autoensamblada (capa de aislante de la Figura 3, hecha de cisteína) haciendo gotear una dispersión de grafeno en agua durante un tiempo de incubación de 8 h. Los receptores se unieron después de que el CBMA, un monómero zwitteriónico, se inmovilizara mediante un ensamblaje electrostático (en el extremo de óxido de grafeno cargado negativamente) en el electrodo para crear una superficie de baja incrustación. Antes de la inmovilización de la especie receptiva (anti- $\alpha$ -sinc), se enjuagaron los electrodos modificados en la superficie con H<sub>2</sub>O y se secaron en un flujo de gas nitrógeno. Los grupos carboxilo terminales se activaron luego con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (0,4 M) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (0,1 M) en agua desionizada durante 40 min, y luego se hicieron reaccionar con 1  $\mu$ M de la respectiva molécula receptora en solución de PBS durante 1 h, a temperatura ambiente. Entonces, se sumergieron las superficies de contacto en etanolamina 1 M (pH de aproximadamente 8,5) para desactivar cualquier grupo carboxílico activado que no hubiera reaccionado y se lavaron con PBS antes de las mediciones (representadas esquemáticamente en la Figura 3).  
30  
35  
40

La respuesta ( $R$ ) obtenida para cada parámetro (de la Figura 4), es decir, la capacitancia cuántica [ $C_q(\bar{\mu})$ ], conductancia cuántica [ $G = kC_q(\bar{\mu})$ ] y energía superficial ( $E[\rho]$ ) [véase también la Ec. (1)], se evaluaron en un intervalo de concentración diana ( $\alpha$ -sinc). Para normalizar la señal de transducción para cada uno de estos parámetros se usó la respuesta relativa. La respuesta relativa ( $RR$ ), para diferentes concentraciones de diana en la frecuencia de resonancia, es decir, en la que  $k = G/C_q$  se maximiza, se calculó, así pues, como  
45

$$RR_{[diana]}^R(\%) = [(R_{[diana]}^k - R_0^k)/R_0^k] \times 100$$

donde  $R_0^k$  representa el valor inicial de los parámetros en ausencia de analito (medición en blanco) y  $R_{[diana]}^k$  es el valor del parámetro después de exponer el electrodo funcionalizado del receptor a la concentración diana correspondiente a la misma frecuencia  $k$ . La recogida de  $RR$  en un intervalo de concentración diana, fue posible para trazar las curvas analíticas para cada uno de los parámetros como se muestra en la Figura 4.  
50

## REIVINDICACIONES

1. Un método de detección para detectar una sustancia química, comprendiendo el método:
  - 5 (A) obtener, mediante espectroscopia de impedancia electroquímica realizada en un intervalo de potenciales aplicados, una pluralidad de mediciones de la impedancia compleja,  $Z^*$ , de un sistema que tiene un electrodo de trabajo que está en contacto con un medio portador que puede comprender dicha sustancia, comprendiendo el electrodo de trabajo fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia, en el que el electrodo de trabajo comprende un sustrato de electrodo funcionalizado con elementos de detección, cuya respuesta electroquímica a los potenciales aplicados es sensible a la unión de dicha sustancia a dichas fracciones receptoras, y teniendo los elementos de detección una dimensión de 0,5 a 10 nm;
  - 10 (B) convertir dicha pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada y/o el componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada;
  - 15 (C) integrar las mediciones de (a)  $C'$ , (b)  $C''$  o (c) cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada para obtener un valor de medición integrado; y
  - (D) detectar si la sustancia química está presente en el medio portador de dicho valor de medición integrado.
2. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en la etapa (A), dicha obtención, mediante espectroscopia de impedancia electroquímica realizada en un intervalo de potenciales aplicados, una pluralidad de mediciones de la impedancia compleja, comprende obtener al menos cinco mediciones de la impedancia compleja a diferentes potenciales aplicados.
3. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha detección en la etapa (D) se realiza comparando dicho valor de medición integrado con uno o más valores de referencia obtenidos mediante la realización de las etapas (A), (B) y (C) en condiciones en las que se conoce el entorno local del electrodo.
4. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sustancia es una especie diana a la que dichas fracciones receptoras pueden unirse específicamente, y siendo dicho método un método para determinar la concentración de dicha especie diana en dicho medio portador.
5. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha especie diana se selecciona del grupo que consiste en proteína CRP, insulina y un marcador de uno o más de entre neurodegeneración, cáncer, infarto de miocardio, diabetes y traumatismo general.
6. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sustancia se selecciona de una proteína lectina, una glicoenzima y un anticuerpo de unión a carbohidratos, y en el que dichas fracciones receptoras son fracciones de carbohidrato.
7. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho electrodo de trabajo forma parte de una glicomatriz que comprende una pluralidad de electrodos de trabajo que están funcionalizados cada uno con diferentes fracciones de carbohidrato.
8. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sustancia es un fármaco candidato, y en el que dichas fracciones receptoras son fracciones que pueden unirse a un fármaco de referencia.
9. Un método de detección de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho electrodo de trabajo forma parte de una matriz que comprende una pluralidad de electrodos de trabajo que están funcionalizados cada uno con dichas fracciones receptoras, siendo dicha matriz, por lo tanto, adecuada para su uso en la detección simultánea de una pluralidad de fármacos candidatos.
10. Un método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos elementos de detección comprenden uno o más de entre especies activas redox, una película molecular, nanopartículas, grafeno, nanotubos de carbono o puntos cuánticos.
11. Un método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho electrodo de trabajo no está funcionalizado con una especie activa redox.
12. Un método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichas fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
13. Un método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos elementos de detección comprenden grafeno.
14. Un aparato para su uso en un método de detección para detectar una sustancia química, aparato que comprende:

- 5 - un espectrómetro electroquímico que comprende un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un potenciostato, comprendiendo dicho electrodo de trabajo fracciones receptoras que son capaces de unirse a dicha sustancia, en el que dicho electrodo de trabajo comprende un sustrato de electrodo funcionalizado con elementos de detección cuya respuesta electroquímica a los potenciales aplicados es sensible a la unión de dicha sustancia a dichas fracciones receptoras, teniendo los elementos de detección una dimensión de 0,5 a 10 nm;
- 10 - un receptor configurado para recibir, desde dicho espectrómetro electroquímico, datos de entrada que comprenden una pluralidad de mediciones de impedancia compleja,  $Z^*$ , en un intervalo de potenciales aplicados;
- un procesador configurado para (i) convertir dicha pluralidad de mediciones de  $Z^*$  en una pluralidad de mediciones del componente real de la capacitancia compleja,  $C'$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada y/o el componente imaginario de la capacitancia compleja,  $C''$ , a una frecuencia  $\omega$  seleccionada e (ii) integrar dichas mediciones de (a)  $C'$ , (b)  $C''$  o (c) cualquier combinación de  $C'$  y  $C''$ , a la frecuencia  $\omega$  seleccionada en función de la tensión aplicada para obtener un valor de medición integrado; y
- 15 - una unidad de salida configurada para los datos de salida generados a partir de dicho valor de medición integrado, comprendiendo dichos datos de salida una indicación de la presencia, ausencia o concentración de la sustancia que se ha de detectar.

15. Un método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o un aparato de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho método de detección es un método de detección de la capacitancia cuántica.

Fig. 1(a)

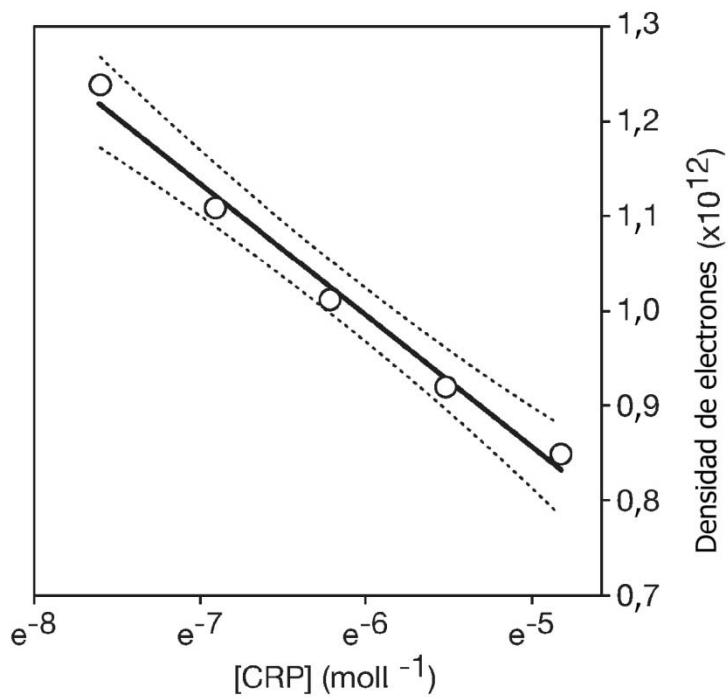


Fig. 1(b)

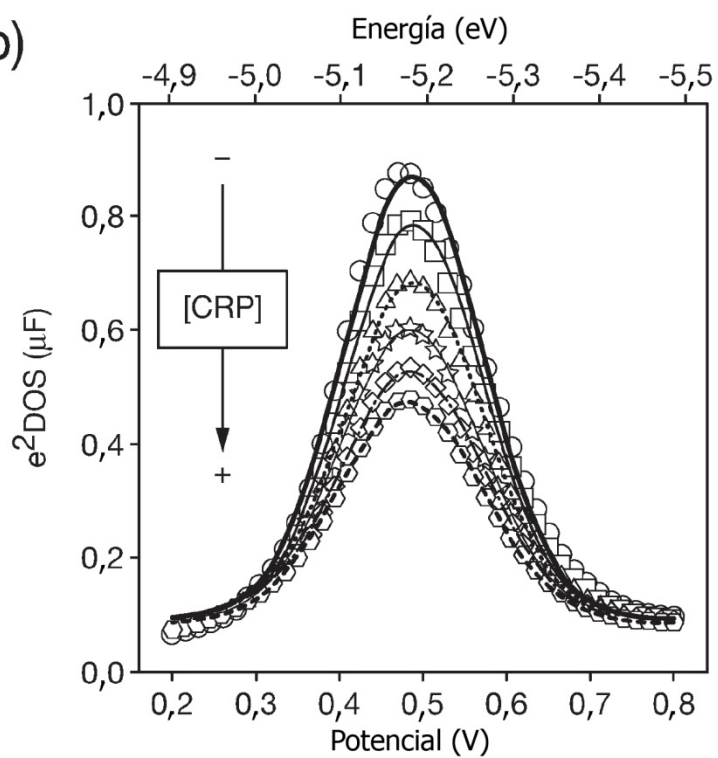


Fig. 2(a)

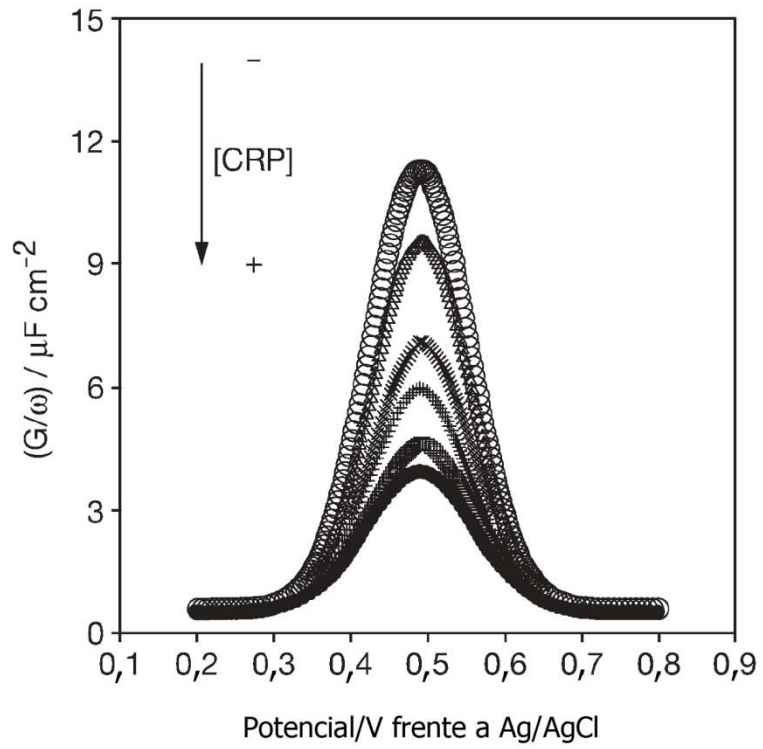


Fig. 2(b)

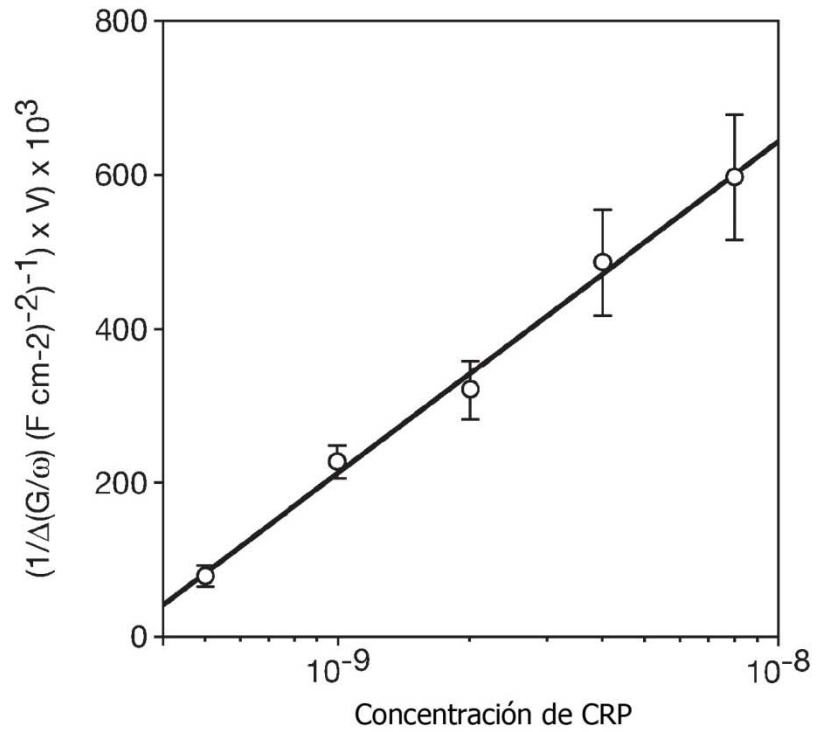




Fig. 3

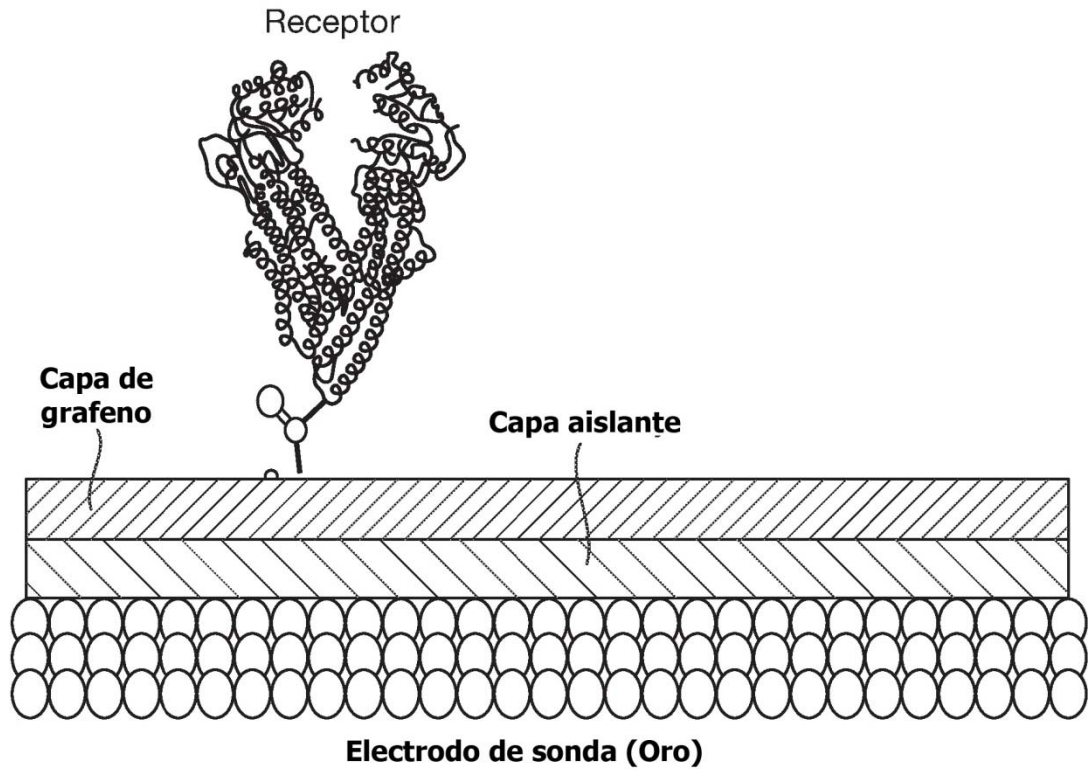


Fig. 4

