

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 537**

51 Int. Cl.:

G01N 27/02 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2013 PCT/GB2013/051124**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2013 E 13720516 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2844988**

54 Título: **Método de detección electroquímica**

30 Prioridad:

01.05.2012 GB 201207583

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

23.01.2020

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:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 738 537 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

Método de detección electroquímica

Antecedentes

5 La detección y cuantificación de biomarcadores de proteínas en muestras biológicas es fundamental para la proteómica, el diseño de fármacos, el pronóstico de enfermedades y el desarrollo terapéutico. La generación de micromatrices de proteínas viables es, sin embargo, un reto. Las micromatrices ópticas basadas en anticuerpos actuales se basan comúnmente en ensayos en sándwich en los que la unión del antígeno al anticuerpo inmovilizado se detecta mediante el uso de un anticuerpo secundario, marcado. Aunque es sensible, este método es laborioso y requiere un anticuerpo secundario específicamente marcado para cada antígeno de interés. Los protocolos de etiquetado son potencialmente perturbadores, también pueden llevar mucho tiempo y pueden generar señales de fondo altas. Los ensayos de detección sin etiqueta basados en resonancia de plasmón o microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), por ejemplo, ofrecen, típicamente, límites de detección de nM, pero requieren el uso de equipos sofisticados y muy costosos.

10 Otras técnicas que utilizan principios electroquímicos también se han desarrollado para ensayos. Los ensayos se generan inmovilizando de manera controlada las biomoléculas receptoras (típicamente anticuerpos, ácidos nucleicos o péptidos) en los electrodos y convirtiendo el evento de unión a la proteína objetivo en una señal eléctrica medible. Uno de los medios más sensibles y poderosos para hacer esto es por impedancia; es decir, mediante la aplicación de un voltaje sinusoidal al electrodo de soporte y la medición de la corriente resultante. Aunque puede ser extremadamente sensible, la medición de la impedancia es la de un solo parámetro eléctrico interfacial y, además, se interpreta comúnmente solo a través de la aplicación de un "circuito equivalente asumido". Existe una variedad de circuitos equivalentes asumidos, y se utilizan para aproximarse a la interfaz electroquímica (por ejemplo, en la superficie de un electrodo de trabajo). En general, se debe elegir o diseñar el circuito equivalente asumido más apropiado para interpretar correctamente los datos. Para que esto tenga éxito, se requiere un grado considerable de conocimiento de la electroquímica en la interfaz electroquímica relevante.

15 La presente invención pretende proporcionar una alternativa a, idealmente, una mejora sobre los métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, sería deseable poder calcular la concentración de biomoléculas en solución con alta precisión usando datos de impedancia, pero sin tener que interpretar los datos usando un circuito equivalente asumido.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra en forma esquemática una definición de una función de transferencia. La función, $H(s)$, se aplica sobre un sistema invariante de tiempo lineal (LTIS).

La Figura 2 muestra esquemáticamente cómo se puede tratar una señal para generar un conjunto de funciones complejas de inmitancia (centro) y un subconjunto de componentes de la función de inmitancia (derecha).

La Figura 3 muestra gráficas de datos de Nyquist superpuestas para una interfaz de anticuerpo anti-CRP preparada a diferentes concentraciones de la diana de CRP.

35 Figura 4A. (Izquierda) muestra R_{ct} representada en función de la concentración del objetivo en una escala logarítmica para la interfaz I (valores obtenidos de un ajuste de valores medios obtenidos de tres conjuntos de datos de impedancia independientes; las barras de error representan errores asociados con ajustes de impedancia a un modelo de circuito equivalente).

40 La Figura 4B (Derecha) muestra la varianza de la parte real de la impedancia con log de concentración de diana; datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, donde R_{ct} y Z' están más correlacionados.

Figura 5A. (Izquierda) muestra R_{ct} representada en función de la concentración del objetivo en una escala logarítmica para una interfaz de enlace CRP alternativa (valores obtenidos de un ajuste de valores medios obtenidos de tres conjuntos de datos de impedancia independientes; las barras de error representan errores asociados con ajustes de impedancia a un modelo de circuito equivalente).

45 La Figura 5B (Derecha) muestra la varianza de la parte real de la impedancia con log de concentración de diana; datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 0.1 Hz, donde R_{ct} y Z' están más correlacionados.

La Figura 6A muestra la varianza de la parte real de la función de inmitancia de la capacitancia con la concentración de CRP para una interfaz receptiva; los datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, donde R_{ct} y Z' están más correlacionados como se muestra en la Figura 8.

50 La Figura 6B muestra una curva analítica de Y'' en función de la concentración logarítmica de la diana (CRP). Las variaciones son del ~45% en el mismo rango de concentración del objetivo.

La Figura 7 muestra los cambios de fase para la interfaz de aptámero en función de la concentración del objetivo a 1 Hz.

La Figura 8A muestra diagramas de impedancia compleja de Bode superpuestos de una interfaz receptiva de CRP a diferentes concentraciones de diana. La frecuencia de muestreo óptima (a partir de la cual se pueden generar las curvas analíticas) es 1 Hz aquí.

5 La Figura 8B muestra diagramas de impedancia compleja de Bode superpuestos para una interfaz sensible a CRP diferente. Aquí, la frecuencia de muestreo óptima es de 0.1 Hz (derecha).

La Figura 9 muestra una curva analítica lineal del valor máximo de la función de relación c''/c' en función de la concentración del objetivo. La dependencia lineal del coeficiente de Pearson es $> 98\%$. Nótese también que la relación de c''/c' no tiene unidad física y no es necesaria una interpretación física de esta relación en su utilización.

10 Las Figuras 10A y 10B muestran, respectivamente, la energía potencial superpuesta de los diagramas real e imaginario de impedancia del complejo de Bode de una película de proteína electroactiva en un electrodo de oro modificado con SAM que muestra una dependencia potencial que es despreciable.

La Figura 11 muestra diagramas capacitivos (componente real, izquierda, imaginario, derecho) complejos de Bode superpuestos de una película de proteína electroactiva azurina en función de la energía potencial electroquímica (es decir, de -100 mV *frente* al electrodo de referencia SCE a 250 mV).

15 La Figura 12 muestra una gráfica de la capacitancia redox (C_r) *frente* al potencial de una película de proteína electroquímicamente activa. La gráfica se centra en cero aquí por conveniencia.

La Figura 13 ilustra esquemáticamente un ejemplo de un programa de ordenador descrito aquí.

La Figura 14 ilustra esquemáticamente un ejemplo adicional de un programa informático descrito en este documento.

20 La Figura 15 muestra una gráfica de M''/C'' frente a autoanticuerpo alfa-sinucleína enriquecido en un 50% de suero sanguíneo. Este gráfico es el resultado de un experimento realizado, que se describe en el Ejemplo 3 a continuación.

La Figura 16 muestra una gráfica de combinación de Z''/C'' , M''/C'' y M''/Y'' versus autoanticuerpo alfa-sinucleína enriquecido en suero sanguíneo al 50%.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona, en un primer aspecto, un método de prueba electroquímica que comprende

25 (i) comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccionar una función de inmitancia o un componente de la misma para usar en una prueba electroquímica;

30 (ii) realizar un paso de prueba electroquímica para un segundo sistema para determinar al menos un valor para la función de inmitancia o componente de la misma seleccionado en el paso (i), y luego, utilizando una relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés, determinar un valor en el parámetro de interés,

en donde el primer sistema proporciona un sistema adecuado para calibrar el parámetro de interés para el segundo sistema. La etapa de prueba electroquímica puede comprender o ser una prueba electroquímica.

35 La presente invención proporciona, en un segundo aspecto, un aparato para uso en un método de prueba electroquímica, en donde el aparato está adaptado para llevar a cabo el método electroquímico de acuerdo con el primer aspecto.

En el presente documento también se describe un programa informático, en donde el programa lleva a cabo un método que comprende:

40 comparando cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccionando una función de inmitancia o un componente de la misma para usar en una prueba electroquímica para un segundo sistema, el primer sistema proporcionando un sistema adecuado para calibrar el parámetro de interés para el segundo sistema.

45 Los presentes inventores han encontrado que al realizar pruebas electroquímicas, diferentes funciones de inmitancia y sus componentes varían en diferentes grados cuando se altera un parámetro de interés. Además, han descubierto que, a diferencia de las técnicas estándar de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), no es necesario utilizar modelos de circuitos equivalentes para intentar modelar el sistema de interés. Las diversas funciones de inmitancia o sus componentes se pueden trazar simplemente contra el parámetro de interés (o su logaritmo) y se puede determinar la variación en un rango del parámetro de interés. Los presentes inventores también han descubierto que se pueden usar relaciones entre diferentes funciones de inmitancia para generar fácilmente una biblioteca de
50 funciones de inmitancia y cómo varían con el parámetro de interés, y luego usarlas en los métodos de prueba. El

método también permite que el rango lineal y/o dinámico de un ensayo se amplíe utilizando diferentes funciones de inmitancia para diferentes rangos de un parámetro.

Funciones de inmitancia y transferencia.

Primero se describirán las funciones de inmitancia y transferencia.

- 5 Una función de inmitancia en la presente solicitud es una función de transferencia electroquímica. A menos que se indique lo contrario, una función de inmitancia es la combinación de sus partes reales e imaginarias, a veces denominada función de inmitancia compleja. Un componente de una función de inmitancia puede incluir la parte real de la función de inmitancia, la parte imaginaria de la función de inmitancia, la amplitud de una función de inmitancia y la fase de la función de inmitancia. Se genera una función de inmitancia aplicando un voltaje o corriente variable, típicamente sinusoidal, entre un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, luego midiendo la respuesta, es decir, la corriente o el voltaje, respectivamente; una función de inmitancia representa una relación entre el voltaje o la corriente aplicada y la corriente o el voltaje resultante, respectivamente. El voltaje o corriente aplicada varía con una frecuencia predeterminada y la corriente o voltaje resultante típicamente tiene la misma frecuencia, pero una fase diferente. Debido a esta diferencia de fase entre el voltaje o corriente aplicada y la corriente o voltaje resultante, la relación puede expresarse en términos complejos, es decir, con una parte real (o componente) y una parte o componente imaginario. Esto se explica con más detalle a continuación con referencia a las funciones de transferencia.

- 20 Las funciones de transferencia (TF) se han utilizado en el análisis de sistemas como los filtros de salida única-entrada única, generalmente en los campos del procesamiento de señales, la teoría de la comunicación y la teoría de control. Una función de transferencia es una representación matemática, en términos de frecuencia espacial o temporal, de la relación entre la entrada y la salida de un Sistema Lineal invariante en el Tiempo (LTIS). Con los dispositivos de generación de imágenes ópticas, por ejemplo, está la transformada de Fourier de la función de dispersión puntual (por lo tanto, una función de la frecuencia espacial), es decir, la distribución de intensidad causada por un objeto puntual en el campo de visión.

- 25 La linealidad es una restricción matemática que permite la conversión del tiempo en el dominio de la frecuencia, lo que significa que la perturbación en el sistema debe ser muy pequeña e independiente del tiempo de la respuesta. La restricción independiente del tiempo está relacionada con el hecho de que se debe mantener la característica de estado estable del sistema durante la perturbación. En la práctica, para garantizar que la restricción de linealidad se aplique, generalmente se utiliza una pequeña perturbación oscilatoria (es decir, voltaje o corriente variable) durante la adquisición de la señal.

- 30 La función de transferencia de un proceso o sistema es característica de su comportamiento dinámico. Para obtener el comportamiento dinámico del sistema como una huella digital, se debe imponer una restricción, es decir, mantener el sistema en estado estable (asegurado por la linealidad en la relación entre la señal de entrada y salida).

- 35 La Figura 1 ilustra esquemáticamente la definición de una función de transferencia. En esta figura, $X(s)$ representa una señal de entrada, $Y(s)$ representa una señal de salida, y $H(s)$ es la función de transferencia aplicada a $X(s)$ para dar $Y(s)$. El $H(s)$ se aplica sobre un sistema invariante de tiempo lineal.

En su forma más simple para la señal de entrada de -tiempo continuo $x(t)$ y la salida $y(t)$, la función de transferencia es el mapeo lineal de la transformada de Laplace $\mathcal{L}\{\}$ de la entrada, $X(s)$, a la salida $Y(s)$ así que

$$Y(s) = H(s)X(s) \quad H(s) = \frac{Y(s)}{X(s)} = \frac{\mathcal{L}\{y(t)\}}{\mathcal{L}\{x(t)\}}$$

donde $H(s)$ es la función de transferencia de la LTIS y

$$X(s) = \mathcal{L}\{x(t)\} = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-st} dt \quad \text{(definición matemática)}$$

40
$$Y(s) = \mathcal{L}\{y(t)\} = \int_{-\infty}^{\infty} y(t)e^{-st} dt \quad \text{(definición matemática)}$$

En particular, si se trata de una señal armónica compleja con un componente sinusoidal con amplitud $X(s)$, frecuencia angular ω y fase $\arg(X)$

$$x(t) = X e^{j\omega t} = |X| e^{j(\omega t + \arg(X))}$$

- 45 donde $X = |X| e^{j \arg(X)}$

es la entrada a un sistema lineal -invariante en el tiempo, de manera que la salida correspondiente es:

$$y(t) = Y e^{j\omega t} = |Y| e^{j(\omega t + \arg(Y))}$$

donde $Y = |Y| e^{j \arg(Y)}$.

- 5 Nótese que, en un sistema lineal invariante en el tiempo, la frecuencia de entrada ω de la perturbación sinusoidal (por ejemplo, el voltaje o corriente aplicada en el contexto de la presente aplicación) no cambia a través de la línea de tiempo del análisis de la señal, solo la amplitud y el ángulo de fase de la señal de salida sinusoidal es modulado por el sistema bajo análisis. La respuesta de frecuencia $H(\omega)$ describe este cambio para cada frecuencia ω de entrada en términos de ganancia:

$$G(\omega) = \frac{|Y|}{|X|} = |H(j\omega)|$$

- 10 y desplazamiento de fase:

$$\phi(\omega) = \arg(Y) - \arg(X) = \arg(H(j\omega))$$

El retardo de fase (es decir, el desplazamiento entre la fase de la entrada y la fase detectada de la salida por la función de transferencia) es:

$$\tau_{\phi}(\omega) = -\frac{\phi(\omega)}{\omega}$$

- 15 El retardo de grupo (es decir, la cantidad de retardo dependiente de la frecuencia introducida en la envoltura de la sinusoide por la función de transferencia) se encuentra al calcular la derivada del desplazamiento de fase con respecto a la frecuencia angular ω ,

$$\tau_g(\omega) = -\frac{\phi(\omega)}{\omega}$$

- 20 La función de transferencia $H(\omega)$ también se puede derivar utilizando la transformada de Fourier así como la transformada de Laplace para el caso donde $s = j\omega$, donde

$$j = \sqrt{-1}.$$

Análisis de señal de impedancia

- 25 La impedancia puede identificarse como la función de transferencia particular en el caso de que la señal de entrada sea un potencial modulado $V(t) = V + \tilde{V}e^{j\omega t}$ (en la que V es un potencial de estado estable sobre el cual se realiza la perturbación y \tilde{V} es la amplitud de perturbación potencial) y una salida de la respuesta en la corriente $I(t) = I + \tilde{I}e^{j(\omega t - \phi)}$, dando como resultado la función de impedancia de impedancia compleja $Z^*(\omega)$, es decir, una función de transferencia compleja:

$$Z^*(\omega) = \frac{\tilde{V} e^{j\omega t}}{\tilde{I} e^{j(\omega t - \phi)}} = |Z| e^{j\phi}$$

- 30 El potencial de estado estable, V , a veces se denomina potencial DC, y el potencial variable aplicado a veces se denomina potencial de CA, que tiene la amplitud \tilde{V} y la frecuencia ω .

La función compleja $Z^*(\omega)$ se puede disolver en dos componentes constituyentes

$$Z^*(\omega) = Z' + jZ''$$

- 35 donde Z' y Z'' son, respectivamente, las partes reales e imaginarias (o los componentes real e imaginario) de la función de transferencia de impedancia. $|Z|$ se conoce como módulo y está matemáticamente relacionada con Z y Z' ($|Z|^2 = Z'^2 + Z''^2$).

Estos términos (Z' y Z'') pueden relacionarse gráficamente en diagramas de Nyquist. Los análisis de impedancia estándar (también conocidos como Espectroscopía de Impedancia Electroquímica, EIS) informan el conjunto de Z' , Z'' ,

$|Z|$ términos y la fase asociada φ , utilizando diagramas de Nyquist o la representación de Bode de estos términos. φ está matemáticamente relacionado con Z' y Z'' por $\varphi = \tan^{-1}(Z''/Z')$.

5 En una realización, la amplitud del potencial de CA aplicado, que típicamente está en forma de onda sinusoidal, puede ser un valor de 1 mV a 100 mV. El potencial de estado estable puede ser cualquier potencial deseado, y puede ser seleccionado por el experto. En una realización, el potencial de estado estacionario tiene una magnitud de al menos 0.1 V (en relación con Ag/AgCl), y puede ser un potencial negativo o positivo.

10 A veces, en los métodos de la técnica anterior, utilizando una metodología de circuito equivalente, el conjunto de datos se puede ajustar y atribuir un significado físico a los términos de ajuste derivados, como capacitancia y resistencia (componentes de la *supuesto* "circuito equivalente"). Típicamente, en estos métodos de la técnica anterior, *solo* se resuelven estos términos o funciones (es decir, Z' , Z'' , $|Z|$, φ y componentes del circuito).¹ El proceso de ajuste en sí también puede ser altamente problemático (ver, por ejemplo, J. R. Macdonald, IMPEDANCE SPECTROSCOPY: OLD PROBLEMS AND NEW DEVELOPMENTS, Electrochimica Acta, Vol. 35, No. 10, pp. 1483-1492, 1990).

Cualquier tecnología sensorial basada en la imagen anterior de EIS ha asociado estas restricciones y, en muchos casos, tanto una configuración de hardware predeterminada como un resultado asumido.

15 De lo anterior, es importante tener en cuenta que la impedancia es una forma específica de la función de transferencia en el caso del análisis de la señal de entrada/salida de voltaje y corriente. A partir de un potencial modulado $V(t) = V + \tilde{V}e^{j\omega t}$ señal de entrada y una respuesta sigmoideal de salida en la corriente $I(t) = I + \tilde{I}e^{j(\omega t - \varphi)}$. Como se explica a continuación, los presentes inventores han encontrado que al generar una pluralidad de funciones de inmitancia para un sistema, y luego determinar cómo las funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un parámetro de interés (por ejemplo, la concentración de una especie diana), es posible seleccionar la función o el componente de inmitancia más adecuado para realizar una prueba posterior. En esta prueba posterior donde el parámetro de interés no se conoce inicialmente, se determina un valor para la función de inmitancia seleccionada o el componente de la función de inmitancia, y luego se usa para convertir a un valor en el parámetro de interés.

25 Los presentes inventores han descubierto que, de hecho, se puede derivar una biblioteca completa de funciones de inmitancia y sus relaciones (véase más adelante), sin tener que recurrir a un ajuste de circuito equivalente. Han encontrado que algunas funciones de inmitancia son más sensibles a los cambios interfaciales altamente específicos que otras. Hay ventajas considerables en la adquisición y el procesamiento de una biblioteca de este tipo, y evita estar vinculado a una función de muestreo y tener que asumir cualquier cosa sobre la mejor función a seguir o el circuito para ajustar los datos.

30 Determinación de las funciones de inmitancia

35 En la presente invención, las funciones de inmitancia pueden seleccionarse de, por ejemplo, una función de transferencia de impedancia compleja (que puede denominarse Z^*), una función de admitancia compleja (que puede denominarse Y^*), una función de transferencia de módulo complejo (que puede denominarse M^*), una función de transferencia de constante dieléctrica compleja (que puede denominarse ϵ^*), una función de transferencia de capacitancia compleja (que puede denominarse C^*), una función de transferencia de conductancia compleja (que puede denominarse σ^*), y combinaciones de las mismas.

40 La función de impedancia de inmitancia y sus componentes se pueden generar como se describe anteriormente. Otras funciones de impedancia pueden determinarse individualmente, es decir, obtenerse directamente, mediante un experimento en el sistema de interés (por ejemplo, el primer sistema como se denomina aquí) o, preferiblemente, determinando una primera función de inmitancia y luego generando una o más funciones de inmitancia adicionales a partir de la primera función de inmitancia. Esto se puede llevar a cabo para una pluralidad de valores conocidos para el parámetro de interés, por ejemplo la concentración de una especie diana en una solución. A partir de esto, se puede determinar la variación en la pluralidad de funciones de inmitancia y sus componentes con el parámetro de interés. La naturaleza de la variación se puede comparar, y la función de inmitancia más apropiada o el componente de la función de inmitancia pueden seleccionarse para su uso en un paso de prueba en donde el parámetro de interés no se conoce, pero debe determinarse.

45 La función de admitancia compleja se puede determinar para un sistema de la siguiente manera. La inversión matemática de la impedancia $Z^*(\omega)$, con sus componentes reales e imaginarios, conduce a la generación de otra función compleja conocida como admitancia, $Y^*(\omega)$. Esta función se puede obtener directamente si la perturbación aplicada es $I(t) = I + \tilde{I}e^{j\omega t}$ con una respuesta $V(t) = V + \tilde{V}e^{j(\omega t - \varphi)}$ que

$$Y^*(\omega) = \frac{\tilde{I} e^{j\omega t}}{\tilde{V} e^{j(\omega t - \varphi)}} = |Y| e^{j\phi}$$

en donde $I(t)$ es la corriente aplicada que tiene un valor de estado estable I , y una corriente superpuesta variable con una magnitud \tilde{I} y frecuencia ω , y $V(t)$ es el potencial de respuesta, que tiene un valor de estado estable V , magnitud de potencial variable \tilde{V} y frecuencia ω , y φ es el desplazamiento de fase.

En una realización, el método puede implicar determinar una primera función de inmitancia para un primer sistema y luego generar una o más funciones de inmitancia segunda a partir de la primera función de inmitancia para el primer sistema, por ejemplo, usando un análisis fasorial, y luego determinar o comparar cómo la primera y una o más segundas funciones de inmitancia varían con el parámetro de interés. La determinación de una primera función de inmitancia para un sistema puede obtenerse a partir del análisis del potencial variable aplicado o actual, y el análisis subsiguiente de la relación entre el potencial variable actual o actual aplicado y la corriente variable o potencial resultante, respectivamente, que puede ser llevado a cabo utilizando cualquier equipo o hardware convencional, como un espectrómetro de impedancia eléctrica, y luego el Análisis de Respuesta de Frecuencia (ARF) se puede usar para generar la primera función de inmitancia. A partir de esta primera función de inmitancia, la una o más segundas funciones de inmitancia pueden generarse utilizando un programa de ordenador que realiza un análisis matemático por fases, por ejemplo utilizando las relaciones que se muestran en la Tabla I a continuación, en la primera función de inmitancia.

En una realización, el método puede involucrar la determinación de una primera función de inmitancia para un primer sistema y luego la generación de una o más segundas funciones de inmitancia a partir de la primera función de inmitancia para el primer sistema, por ejemplo, utilizando un análisis fasorial, derivando al menos un componente para la primera función de admitancia y al menos un componente para cada una de la una o más segundas funciones de inmitancia, y luego determinar o comparar cómo el al menos un componente para la primera función de admitancia y el al menos un componente para cada una de la una o más segundas inmitancia las funciones varían según el parámetro de interés y, opcionalmente, la selección de un componente para su uso en una prueba electroquímica. La prueba electroquímica puede ser una prueba electroquímica, por ejemplo, una prueba para determinar la concentración de una especie en un medio portador.

En una realización, el método puede involucrar la determinación de una primera función de inmitancia para un primer sistema, que es una función de inmitancia de impedancia, y luego generar una o más funciones de inmitancia de segundo para el primer sistema que no sea una función de impedancia de la primera función de inmitancia, para por ejemplo, usando un análisis de fasorial y luego determinando cómo la primera y una o más funciones de la segunda inmitancia y/o sus componentes varían con el parámetro de interés y, opcionalmente, seleccionando un componente para usar en una prueba electroquímica.

En una realización, el método puede involucrar la determinación de una primera función de inmitancia para un primer sistema, que es una función de transferencia de impedancia compleja (Z^*), y luego generar una o más segundas funciones de inmitancia para el primer sistema seleccionado de una función de admitancia compleja (que puede denominarse Y^*), una función de transferencia de módulo complejo (que puede denominarse M^*), una función de transferencia de constante dieléctrica compleja (que puede denominarse ϵ^*), una función de transferencia de capacitancia compleja (que puede denominarse C^*), una función de transferencia de conductancia compleja (que puede denominarse σ^*), por ejemplo, utilizando un análisis fasorial, y luego determinar cómo la primera y una o más segundas funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con el parámetro de interés, y opcionalmente, seleccionando un componente para usar en una prueba electroquímica.

Los presentes inventores han descubierto que pueden generar, a partir de una primera función de inmitancia, una pluralidad de otras funciones de inmitancia utilizando el análisis fasorial. El análisis fasorial se puede llevar a cabo utilizando cualquier medio computacional adecuado, por ejemplo, un programa de ordenador. Las relaciones fasoriales entre las diferentes funciones de inmitancia se dan en la Tabla I a continuación.

Si se obtiene una de las funciones de la tabla de funciones de inmitancia (o matriz), cualquier otra puede obtenerse fácilmente a través de las operaciones matemáticas tabuladas a continuación en la "matriz de inmitancia". Por ejemplo, Z^* es una función de la frecuencia $Z^*(s)$ durante las mediciones. La función compleja, $Z^*(s) = Z' + jZ''$, se puede obtener de un equipo EIS comercial que genera una tabla de Z' y Z'' para cada ω frecuencia de muestreo. Esto proporciona una tabla (o archivo ASCII) con tres columnas de datos: $\omega_i \dots \omega_f$ (primera columna), $Z'_i \dots Z'_f$ (primera columna) y $Z''_i \dots Z''_f$, donde i es la frecuencia inicial y $i-f$ es la frecuencia final y $i-f$ es el rango de frecuencia del experimento. Estas columnas de números se pueden tratar matemáticamente fácilmente, utilizando las relaciones mostradas en la tabla, para generar las otras funciones tabuladas.

Tabla I - Funciones de la inmitancia y sus relaciones fasoriales

	M^*	Z^*	Y^*	ϵ^*	C^*	σ^*
M^*	M^*	ϕZ^*	$\phi(Y^*)^{-1}$	$(\epsilon^*)^{-1}$	$C_e(C^*)^{-1}$	$\phi(x\sigma^*)^{-1}$
Z^*	$\phi^{-1}M^*$	Z^*	$(Y^*)^{-1}$	$\phi^{-1}(\epsilon^*)^{-1}$	$\phi^{-1}C_e(C^*)^{-1}$	$x^{-1}(\sigma^*)^{-1}$
Y^*	$\phi(M^*)^{-1}$	$(Z^*)^{-1}$	Y^*	$\phi\epsilon^*$	$\phi C_e^{-1}C^*$	$x\sigma^*$

	M^*	Z^*	Y^*	ε^*	C^*	σ^*
ε^*	$(M^*)^{-1}$	$\phi^{-1}(Z^*)^{-1}$	$\phi^{-1}Y^*$	ε^*	$C_e^{-1}C^*$	$\phi^{-1}x\sigma^*$
C^*	$C_e(M^*)^{-1}$	$C_e\phi^{-1}(Z^*)^{-1}$	$C_e\phi^{-1}Y^*$	$C_e\varepsilon^*$	C^*	$s^{-1}x\sigma^*$
σ^*	$\phi(xM^*)^{-1}$	$(xZ^*)^{-1}$	$x^{-1}Y^*$	$\phi x^{-1}\varepsilon^*$	$sx^{-1}C^*$	σ^*

$s = j\omega$ y $\phi = sC_e$ en que $C_e = \varepsilon_0 x$ y donde $x = A/l$. A es el área efectiva del electrodo (determinada experimentalmente), l es el espesor de una película/monocapa modificadora del electrodo (determinada experimentalmente o asumida), y ε_0 es la permisividad dieléctrica del espacio libre, 8.854×10^{-12} F/m. x es, por lo tanto, un parámetro geométrico.

- 5 En la tabla anterior, Z^* indica una función de transferencia de impedancia compleja, M^* indica una función de transferencia de módulo, ε^* indica una función de transferencia dieléctrica compleja, C^* indica una función de transferencia de capacitancia compleja, σ^* indica una función de transferencia de conductancia compleja.

10 Cada una de las entradas en la tabla anterior indica cómo debe tratarse una primera función de inmitancia determinada (que se muestra en el encabezado de la primera fila) para obtener otra función de inmitancia (que se muestra en los encabezados de la primera columna). La tabla I anterior, por ejemplo, muestra el fasorial (definido aquí como $s = j\omega$,

donde $j = \sqrt{-1}$) o inversión compleja (por ejemplo, $Z^* = (Y^*)^{-1}$) intercambio entre diferentes funciones de inmitancia.

15 Los presentes inventores han encontrado que aunque las funciones de inmitancia mostradas en la Tabla I están relacionadas matemáticamente, los cambios en la señal de corriente analizada (o señal potencial) inducida por un evento interfacial en la superficie de un electrodo de trabajo, podrían afectar a algunos dramáticamente y otros como mínimo (como se demuestra en los Ejemplos). Por ejemplo, la función de capacitancia compleja tiene un significado totalmente diferente y un campo de detección potencialmente diferente a la función de impedancia compleja (adquirida simultáneamente). El acceso a uno u otro aspecto físico del sistema depende del desplazamiento de fase y el módulo. En otras palabras, todas las funciones y los significados físicos relacionados pueden derivarse del análisis del desplazamiento de fase y el módulo de el voltaje/corriente de salida.

20 En general, como se indicó anteriormente para cada función de inmitancia, habrá un subconjunto de componentes que se pueden determinar, es decir, partes imaginarias y reales, módulo y una fase asociada. Por ejemplo, la función de inmitancia de capacitancia compleja C^* se puede resolver en su componente imaginario C'' , su componente real C' , el módulo $|C|$ y la fase asociada φ .

25 Los presentes inventores han encontrado que típicamente hay una función de inmitancia o un componente de la función de inmitancia que es más sensible que los demás a un cambio en un parámetro de interés en un cierto rango. Puede ser que, en un cierto rango para un parámetro de interés, una función de inmitancia particular o componente de la misma sea la más sensible, pero para otros rangos, otras funciones de inmitancia o componentes de la misma sean más sensibles. Si la superficie del electrodo de trabajo que aplica el potencial o la corriente variable es biosensorial, por ejemplo al tener una o más moléculas de sonda específicas para una molécula diana (algunas veces denominada analito), se puede generar una pluralidad de funciones de inmitancia en función de su exposición a la molécula diana a diferentes concentraciones. La variación de las diferentes funciones de inmitancia y sus componentes sobre las diferentes concentraciones se puede comparar, y la función de inmitancia que es más apropiada, por ejemplo se puede seleccionar el más sensible o que tiene la mayor correlación con la variación en la concentración. La generación de funciones de inmitancia, sus componentes y su comparación con el parámetro de interés, y la selección de la función de inmitancia más apropiada se pueden llevar a cabo automáticamente, por ejemplo, en un dispositivo que incluye un software que puede llevar a cabo el método.

40 Los presentes inventores han descubierto que se puede obtener una información considerablemente mayor sobre la interfaz en un electrodo de trabajo (que puede ser, por ejemplo, una interfaz sensorial) que las formas estándar de análisis de impedancia.

45 Los presentes inventores han encontrado que la medición de la corriente o potencial modulada en función de un voltaje o corriente variable, respectivamente, se puede usar para generar una biblioteca completa de funciones de inmitancia para un sistema de interés (por ejemplo, el primer sistema como se denomina aquí), cada uno con un subconjunto de componentes; la interpretación física de estos y su respuesta a los cambios (por ejemplo, eventos de reconocimiento) en cualquier electrodo dado se demostrará en los siguientes Ejemplos. Los presentes inventores han encontrado que el método es adecuado para la automatización, de manera que un dispositivo puede llevar a cabo, para un sistema de interés (por ejemplo, el primer sistema descrito aquí) la determinación de las funciones de inmitancia y/o sus

componentes, la comparación de la inmitancia funciones y/o componentes de los mismos con la variación de un parámetro de interés, y la selección de la función de inmitancia más apropiada o el componente de función de inmitancia para usar en una prueba electroquímica posterior en la cual el parámetro de interés es desconocido en un segundo sistema. El primer sistema proporciona un sistema de calibración adecuado para el segundo sistema.

- 5 El método puede implicar
- (i) determinar una pluralidad de funciones de inmitancia para un primer sistema, y determinar o comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para el primer sistema, y luego seleccionar una inmitancia función o componente de la misma para uso en una prueba electroquímica;
- 10 (ii) realizar un paso de prueba electroquímica para un segundo sistema para determinar al menos un valor para la función de inmitancia o componente de la misma seleccionado en el paso (i), y luego, utilizando una relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el cierto parámetro, determinar un valor en el parámetro de interés.
- 15 El método puede involucrar la determinación de una pluralidad de funciones de inmitancia para un primer sistema, derivar al menos un componente para cada función de inmitancia y comparar cómo el al menos un componente para cada función de inmitancia varía con un cambio en un parámetro de interés para el primer sistema. y luego seleccionando un componente de una de las funciones de inmitancia, que luego puede usarse en una prueba electroquímica.
- 20 En una realización, el método puede implicar comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccionar una función de inmitancia o un componente del mismo para usar en una prueba electroquímica.
- 25 En una realización, el método puede implicar determinar una primera función de inmitancia para un primer sistema, que es una función de inmitancia de impedancia, determinar una o más segundas funciones de inmitancia distintas a una función de inmitancia de impedancia para el primer sistema, y luego determinar cómo una o más funciones de segunda inmitancia y/o sus componentes varían con el parámetro de interés y, opcionalmente, seleccionan una función de inmitancia o un componente de la misma para usar en una prueba electroquímica.
- 30 Preferiblemente, la determinación de la pluralidad de funciones de inmitancia se lleva a cabo en una pluralidad de frecuencias de potencial o de corriente aplicadas, y la comparación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con el parámetro de interés se lleva a cabo en cada una de las frecuencias aplicadas. y el método luego implica seleccionar una frecuencia para usar, junto con una función de inmitancia o un componente de función de inmitancia, en la prueba electroquímica subsiguiente de acuerdo con criterios predeterminados. Por ejemplo, la frecuencia y una función de inmitancia o componente de función de inmitancia pueden seleccionarse de tal manera que juntas proporcionen la mayor variación en la función de inmitancia y/o componente(s) de la misma con el parámetro de interés y/o la mayor correlación en la variación de la función de inmitancia y/o componente(s) de la misma con el parámetro de interés.
- 35 En una realización, la comparación implica (i) determinar o comparar el grado de variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con el cambio en el parámetro de interés y/o (ii) determinar o comparar la correlación de la variación de las funciones de inmitancia y/o funciones con el cambio en el parámetro de interés.
- 40 En una realización, la determinación implica trazar un componente de cada función de inmitancia contra la concentración de una especie en un medio portador en el primer sistema o el logaritmo de la concentración de una especie en un medio portador en el primer sistema.
- 45 En una realización, la selección de la función de inmitancia o componente de la misma para uso en una prueba electroquímica se selecciona de (i) seleccionar de una función de inmitancia que tenga la mayor variación con la cantidad de cambio en el parámetro de interés; (ii) seleccionar una función de inmitancia que tenga la mayor correlación con el parámetro de interés; (iii) seleccionar una función de inmitancia con una variación con la cantidad de cambio en el parámetro de interés sobre un umbral preseleccionado y/o (iv) seleccionar una función de inmitancia que tenga una correlación con el parámetro de interés sobre un umbral preseleccionado; o una combinación de los mismos.
- 50 En una realización, el método implica, aplicar un potencial alterno o una corriente alterna a un primer sistema sobre una pluralidad de valores para un parámetro de interés y monitorización, respectivamente, la respuesta en términos de, respectivamente, el potencial alterno de salida o el potencial alterno de salida, y utilizando una relación entre el potencial alterno aplicado o la corriente alterna y, respectivamente, la corriente alterna de salida o el potencial alterno de salida, calcular una pluralidad de funciones de inmitancia y/o componentes de la misma para cada uno de los valores del parámetro de interés.
- 55 La frecuencia del potencial alterno y/o el voltaje alterna pueden estar en el rango de 1 mHz a 1 MHz.

El método de prueba electroquímica puede ser un método implementado por ordenador, en donde el método se lleva a cabo usando un ordenador, que puede controlar el aparato para llevar a cabo pruebas electroquímicas, por ejemplo un espectrómetro de impedancia electroquímica, y que puede llevar a cabo automáticamente los pasos de determinación, comparación y selección, como se describe en este documento.

- 5 Preferiblemente, en la determinación y/o comparación, el método no utiliza un circuito equivalente asumido. Preferiblemente, el método es un método sin etiqueta para detectar una especie diana.

Aquí también se describe un programa informático para llevar a cabo y/o controlar aparatos para llevar a cabo el método.

- 10 La presente divulgación también proporciona un programa informático, en donde el programa lleva a cabo un método que comprende: comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccionar una función de inmitancia o un componente del mismo para uso en una prueba electroquímica para un segundo sistema, el primer sistema proporciona un sistema adecuado para calibrar el parámetro de interés para el segundo sistema. La comparación puede ser como se describe aquí. La comparación puede implicar (i) comparar el grado de variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con el cambio en el parámetro de interés y/o (ii) comparar la correlación de la variación de las funciones de inmitancia y/o funciones con el parámetro de interés. La selección de la función de inmitancia o componente de la misma para su uso en una prueba electroquímica puede seleccionarse de criterios predeterminados, por ejemplo criterios seleccionados de (i) seleccionar una función de inmitancia que tenga la mayor variación con la cantidad de cambio en el parámetro de interés; (ii) seleccionar una función de inmitancia que tenga la mayor correlación con el parámetro de interés; (iii) seleccionar una función de inmitancia con una variación por encima de un umbral preseleccionado con la cantidad de cambio en el parámetro de interés y/ o (iv) seleccionar una función de inmitancia que tenga una correlación con el parámetro de interés por encima de un umbral preseleccionado.

- 25 Opcionalmente, antes de la comparación, el programa genera, a partir de una primera función de inmitancia para un primer sistema, una o más segundas funciones de inmitancia para el primer sistema, y luego determina cómo varían la primera y una o más segundas funciones de inmitancia y/o sus componentes con el parámetro de interés. Puede llevarse a cabo como se describe anteriormente, por ejemplo, con referencia a las relaciones entre las funciones de inmitancia dadas en la Tabla I anterior. La primera función de inmitancia puede ser una función de inmitancia de impedancia compleja, y la segunda función de inmitancia seleccionada entre una función de admitancia compleja, una función de transferencia de módulo complejo, una función de transferencia de constante dieléctrica compleja, una función de transferencia de capacitancia compleja, una función de transferencia de conductancia compleja y combinaciones de los mismos (incluidas, en un ejemplo, combinaciones de sus componentes reales e imaginarios).

- 30 El programa informático puede adaptarse además para controlar un aparato para llevar a cabo una etapa de prueba electroquímica para un segundo sistema para determinar al menos un valor para la función de inmitancia o componente de la misma seleccionado después de la etapa de comparación, y luego, utilizando una relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés, determinar un valor en el parámetro de interés. El aparato puede ser como se describe aquí.

El programa informático puede almacenarse/distribuirse en un medio adecuado, como un medio de almacenamiento óptico o un medio de estado sólido suministrado junto con o como parte de otro hardware, pero también puede distribuirse en otras formas, como a través de Internet u otros sistemas de telecomunicación cableados o inalámbricos.

- 40 Un ejemplo de un programa informático se ilustra esquemáticamente en la Figura 13, en la que, en la etapa 1301, el programa compara cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema. En la etapa subsiguiente, 1302, el programa selecciona una función de inmitancia o un componente de la misma.

- 45 Un ejemplo adicional de un programa informático se ilustra esquemáticamente en la Figura 14, en la que, en el paso 1401, el programa compara cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema. En la etapa posterior, 1402, el programa selecciona una función de inmitancia o un componente de la misma. En este ejemplo, el programa incluye un paso 1403, antes del paso 1401, que genera, a partir de una primera función de inmitancia para un primer sistema, una o más segundas funciones de inmitancia para el primer sistema, y luego determina cómo el primer y uno o más segundos las funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un parámetro de interés.

- 50 La invención proporciona además un aparato para uso en un método de prueba electroquímica, en donde el aparato está adaptado para llevar a cabo el método electroquímico como se describe en el presente documento. El aparato puede comprender un espectrómetro de impedancia electroquímica. En una realización, el aparato comprende un espectrómetro de impedancia electroquímica que es capaz de medir al menos una función de inmitancia, preferiblemente una función de impedancia compleja. El aparato está adaptado preferiblemente para (i) comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccione una función de inmitancia o un componente de la misma para usar en una prueba electroquímica; y (ii) realizar un paso de prueba electroquímica para un segundo sistema para determinar al

menos un valor para la función de inmitancia del componente seleccionado en el paso (i), y luego, utilizando una relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés, determinar un valor en el parámetro de interés. La comparación y selección en el paso (i) puede llevarse a cabo automáticamente por el aparato. El aparato puede adaptarse para llevar a cabo la etapa de prueba electroquímica para el segundo sistema automáticamente. El aparato puede adaptarse adicionalmente para llevar a cabo una etapa, antes de la etapa de comparación (i), de determinar para el primer sistema cómo la pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés y determinar la relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés. El aparato puede adaptarse para llevar a cabo una etapa, antes de la etapa de comparación (i), de determinar una primera función de inmitancia para un primer sistema y luego generar una o más segundas funciones de inmitancia a partir de la primera función de inmitancia para el primer sistema, por ejemplo usando un análisis de fasorial y luego determinar cómo la primera y una o más segundas funciones de inmitancia varían con el parámetro de interés. En una realización, la primera función de inmitancia es una función de impedancia compleja, y la una o más segundas funciones de inmitancia se seleccionan de una función de admittancia compleja, una función de transferencia de módulo complejo, una función de transferencia de constante dieléctrica compleja, una función de transferencia de capacitancia compleja, una función de transferencia de conductancia compleja, y combinaciones de los mismos (incluidas combinaciones de sus componentes reales e imaginarios). La determinación puede ser una medición directa de los datos electroquímicos del primer sistema para obtener una función de inmitancia, por ejemplo la primera función de la inmitancia.

Si el aparato comprende un espectrómetro de impedancia electroquímica, el espectrómetro de impedancia electroquímica puede tener un diseño estándar. El espectrómetro de impedancia electroquímica puede comprender un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y, si se desea, un electrodo de referencia. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un medio para aplicar, controlar y variar un potencial entre los electrodos de trabajo y el contador, y un medio para medir la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un potencióstato para controlar el potencial y medir la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un medio para calcular los datos de impedancia a partir del potencial aplicado y la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica puede comprender un medio para calcular la resistencia de transferencia de electrones del electrodo de trabajo.

Selección y optimización de las funciones de impedancia para una aplicación específica

Como se describió anteriormente, los presentes inventores han encontrado que el método de la presente invención se puede automatizar en un dispositivo, de modo que la función de inmitancia más apropiada o el componente de la función de inmitancia para una variación en un parámetro de interés se seleccione automáticamente para un sistema de interés, por ejemplo el primer sistema como se describe en este documento, y luego esta función de inmitancia es utilizada en un segundo sistema para determinar un valor para el parámetro de interés a partir de un valor medido de la función de inmitancia seleccionada o componente de función de inmitancia. El método es ampliamente aplicable y se puede usar en una Plataforma de Respuesta de Frecuencia (MFRP) individual o Multiplexada para monitorizar cualquier superficie sensible o sensible a LTI (invariante de tiempo lineal). La pluralidad de funciones de inmitancia analizadas anteriormente se puede generar a partir de cualquier conjunto de datos de voltaje de corriente inicial dado para un sistema de interés automáticamente. Para estas funciones, se pueden grabar el imaginario, el real, el módulo y la fase. Todo esto puede realizarse de manera análoga al concepto de conectar y reproducir en computación, sin la intervención del usuario (y sin suposiciones previas sobre la superficie o el electrodo de trabajo o la función óptima o el circuito equivalente). Preferiblemente, para un dispositivo que lleva a cabo el método para un sistema dado y la variación de un parámetro de interés, el software generará y/o comparará una biblioteca de (es decir, una pluralidad de) funciones de inmitancia, y calibrará automáticamente el dispositivo con la función de inmitancia que se selecciona de acuerdo con criterios predeterminados, por ejemplo, la mayor sensibilidad a la variación en el parámetro de interés y/o la mayor correlación con la variación en el parámetro de interés.

Una vez que se haya seleccionado la función de inmitancia más apropiada, el componente de la función de inmitancia o la combinación de dichos componentes en el método para un sistema, la frecuencia de análisis se optimizará y la adquisición de datos subsiguiente será mucho más rápida (ya que solo los datos específicos se adquieren de manera óptima) se recopilará la frecuencia), es decir, la necesidad de un rango de frecuencia completo de datos solo es necesaria en la primera selección para el análisis de la función de calibración e inmitancia. Los presentes inventores consideran que el método y los aspectos relacionados descritos aquí son únicos y representan una mejora en los procedimientos electroanalíticos actuales. Los presentes inventores consideran que el método puede usarse en la detección de marcadores de enfermedad, donde los aptámeros o anticuerpos receptivos, por ejemplo, se inmovilizan a través de diferentes medios químicos en un electrodo de trabajo y se usan para detectar objetivos de composición química y física notablemente variable. Los cambios interfaciales subsiguientes en el electrodo de trabajo pueden ser capacitivos, impedancia, corriente, fase, resistencia de transferencia de carga o incluso de cualquier otra función de inmitancia (o componente o combinación de los mismos). Típicamente, en los métodos de la técnica anterior, por ejemplo. En la espectroscopía de impedancia electroquímica estándar, solo uno de estos parámetros ha sido evaluado, a menudo solo en una frecuencia y por los usuarios que requieren un buen conocimiento electroquímico. En muchos casos, este enfoque falla o está limitado a una sola formulación/objetivo de superficie específica. Se sabe que el parámetro más sensible refleja en gran medida la química de la superficie y la química de reconocimiento empleada en la superficie del chip y, por lo tanto, es poco probable que un enfoque único sea eficaz en muchas situaciones, o al menos sea improbable que se optimice, particularmente si se busca detectar varios marcadores simultáneamente en

un formato multiplexado (utilizando matrices de electrodos funcionalizados de manera diferente con diferentes receptores).

Los presentes inventores consideran que el método presente y los aspectos relacionados tienen una aplicación considerable y poderosa en muchas áreas. El método se puede usar, por ejemplo, en la detección sin marcación de moléculas diana biológicas (inmunoensayos) y en bioelectroquímica fundamental (y, por lo tanto, potencialmente biosensores basados en enzimas).

5

El término sistema, en la presente solicitud, indica un entorno físico alrededor de un electrodo de trabajo utilizado para obtener los datos electroquímicos para generar las funciones de inmitancia. El primer sistema proporciona un sistema adecuado para calibrar el parámetro de interés para un segundo sistema. Por ejemplo, el primer y segundo sistema pueden tener una o más características comunes seleccionadas de, pero no limitadas a, electrodos del mismo o sustancialmente del mismo tipo, unidades estructurales de sonda inmovilizadas en los electrodos, en donde las unidades estructurales de sonda y/o los electrodos son sustancialmente el mismo o del mismo tipo, especies diana de sustancialmente el mismo tipo o del mismo tipo, que opcionalmente pueden estar en un medio portador de sustancialmente el mismo o del mismo tipo. En una realización, todos o sustancialmente todos los aspectos del primer y segundo sistemas son iguales, excepto por la posible diferencia en el parámetro de interés, por ejemplo concentración de una especie diana, para los sistemas primero y segundo.

10
15

En una realización, el primer y/o segundo sistema comprende un medio portador que comprende una especie diana y un electrodo de trabajo en contacto con el medio portador, y, opcionalmente, el parámetro de interés es la concentración de la especie diana en el medio portador. El electrodo de trabajo puede tener en su superficie unidades estructurales de sonda que se unen a la especie diana.

20

El medio portador puede estar en forma gaseosa, en forma líquida o en forma sólida.

El medio portador puede estar en forma líquida, y la especie diana puede suspenderse y/o disolverse en el medio portador. Las especies diana pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos, anticuerpos, nanopartículas, drogas, toxinas, gases nocivos, químicos peligrosos, explosivos, partículas virales, células, organismos multicelulares, citoquinas y quimioquinas, ganietocitos, orgánulos, lípidos, secuencias de ácidos nucleicos, oligosacáridos, intermedios químicos de vías metabólicas y macromoléculas. En realizaciones preferidas, la especie diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una molécula biológica, más adecuadamente una macromolécula biológica, lo más adecuadamente un polipéptido.

25

Si la especie diana es una proteína, la proteína puede seleccionarse de, entre otras, proteínas nativas, proteínas desnaturalizadas, fragmentos de proteínas y proteínas expresadas procarióticamente o eucarióticamente. La proteína puede tener su significado normal en la técnica, y más preferiblemente "proteína" se refiere a una molécula polipeptídica. Dicho polipéptido puede comprender modificaciones tales como glicosilación; fosforilación u otras modificaciones similares.

30

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

35

Si la especie diana es una nanopartícula, la nanopartícula puede seleccionarse, pero no se limita a, una o más de nanopartículas aislantes, metálicas o semiconductoras.

Si la especie diana es un fármaco, el fármaco se puede seleccionar de, entre otras cosas, alcohol (por ejemplo, etanol), anfetaminas, nitrato de amilo, heroína, ketamina, esteroides anabólicos, LSD, disolventes, cannabis, cocaína (como la cocaína clorhidrato o 'coca'), tabaco, calmantes, *crack* (es decir, base libre de cocaína), éxtasis y/o gammahidroxitirato (GHB). Alternativamente, en algunas realizaciones, el fármaco puede ser una sustancia medicinal.

40

La especie diana puede ser un fármaco candidato, por ejemplo una entidad química o biológica que puede probarse o cribarse con respecto una actividad o propiedad particular utilizando la presente invención.

Si la especie diana es una toxina, la toxina puede seleccionarse, pero no se limita a, una o más toxinas que se originan de animales, plantas o bacterias.

45

Si la especie diana es una partícula viral, la partícula viral se puede seleccionar de, pero no se limita a, una o más partículas virales con y sin genoma.

Si la especie diana es una célula, la célula puede seleccionarse, pero no se limita a, una o más de células progenitoras pluripotentes, células humanas (por ejemplo, células B, células T, mastocitos, fagocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales), células cancerosas (por ejemplo, las originadas por cáncer de hígado, hueso, cervical, páncreas, colorrectal, próstata, epidérmico, cerebro, mama, pulmón, testicular, renal, vejiga), organismos unicelulares de origen no humano, algas, hongos, bacterias, células vegetales, huevos de parásitos, plasmodios y micoplasmas.

50

Si la especie diana es un orgánulo, el orgánulo puede seleccionarse de, entre otros, uno o más núcleos, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosoma, fagosoma, membranas intracelulares, membranas extracelulares, citoesqueleto, membrana nuclear, cromatina, matriz nuclear y cloroplastos.

5 Si la especie diana es un lípido, el lípido se puede seleccionar, entre otros, uno o más de los lípidos de señalización, lípidos estructurales, fosfolípidos, glicolípidos y ácidos grasos.

Si la especie diana es la secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico puede seleccionarse, pero no se limita a, uno o más de ADN, ADNc, ARN, ARNr, ARNm, miARN y ARNt.

Si la especie diana es un oligosacárido, el oligosacárido puede seleccionarse, pero no se limita a, uno o más de oligosacáridos de origen humano, animal, vegetal, fúngico o bacteriano.

10 En una realización preferida, la especie diana es una proteína. El método y otros aspectos de la invención pueden usarse para la detección o identificación de una proteína.

La especie diana puede ser cualquier antígeno o analito que sea indicativo de una enfermedad particular. El objetivo se puede seleccionar de, por ejemplo, la enzima convertidora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1; adiponectina; receptor específico del producto final de glicosilación avanzada; glicoproteína alfa-2-HS; angiogenina, ribonucleasa; familia de la ARNasa A, 5; apolipoproteína A-I; apolipoproteína B (incluido el antígeno Ag (x)); apolipoproteína E; Proteína X asociada a BCL2; CLL de células B/linfoma 2; complemento C3; quimioquina (motivo C-C) ligando 2; CD 14, soluble; CD 40, soluble; cdk5; proteína C-reativa, relacionada con pentraxina; catepsina B; dipeptidil peptidasa IV; factor de crecimiento Epidérmico; endoglina; Fas; fibrinógeno; ferritina; hormona del crecimiento 1; alanina aminotransferasa; factor de crecimiento de hepatocitos; haptoglobina; choque térmico 70kDa proteína 1 B; molécula de adhesión intercelular 1; factor de crecimiento similar a la insulina 1 (somatomedina C); receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1; proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1; proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 2; -proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3; interleuquina 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 a la obesidad, ratón); activador del plasminógeno, tejido; propiomelanocortina (adrenocorticotropina/beta-lipotropina/hormona estimulante del melanocito alfa/hormona estimulante del beta-melanocito/beta-endorfina); proinsulina; resistina; selectina e (molécula de adhesión endotelial 1); selectina P (proteína de membrana de gránulo 140 kDa, antígeno CD62); inhibidor de la peptidasa de serpina, clado E (nexina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), miembro 1; suero/gluocorticoide regulado quinasa; globulina fijadora de hormonas sexuales; factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann); TIMP metalopeptidasa inhibidor 2; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 1 B; molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1); factor de crecimiento vascular endotelial; Factor II, Factor V, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XII, F/productos de degradación de fibrina, trombina-antitrombina III complejo, fibrinógeno, plasminógeno, protrombina y factor de 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. El objetivo puede ser un objetivo asociado con el control de la diabetes. En una realización, el objetivo puede seleccionarse de glucosa, insulina, receptor alfa de interleuquina 2 (IL2-RA), proteína C -reactiva (PCR) y hemoglobina glucosilada (HbA1c). Si la diana es la glucosa, las unidades estructurales de la sonda se pueden seleccionar de, por ejemplo, el elemento de reconocimiento molecular del ensayo 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 unidades estructurales de la sonda pueden comprender o consistir en un anticuerpo monoclonal específico para IL-2RA.

15
20
25
30
35
40

El medio portador puede comprender una muestra de fluido biológico, por ejemplo recogida de un sujeto humano o animal. Las especies diana, que pueden estar en la muestra de fluido biológico, pueden seleccionarse de productos metabólicos como glucosa, lactato, ácido úrico, ácido ascórbico, catecolaminas como norepinefrina, epinefrina y dopamina, O₂, iones como sodio y calcio, células humanas completas, patógenos que incluyen bacterias, hongos, parásitos y partículas virales, iones metálicos como el zinc y biomarcadores de proteínas como las citoquinas inflamatorias.

45

Las unidades estructurales de la sonda se pueden seleccionar de, pero no se limitan a, uno o más de una macromolécula biológica, un aptámero, un péptido aptámero, un reactivo de reconocimiento presentado en el contexto de otra estructura de ingeniería, un ADN aptámero, un ARN aptámero, una entidad química, una entidad química de potencial valor terapéutico, un oligosacárido, un péptido, una proteína y un anticuerpo. Preferiblemente, las unidades estructurales de sonda se seleccionan de uno o más de un anticuerpo, un ácido nucleico y un péptido. Preferiblemente, las unidades estructurales de sonda se unen selectivamente a la especie diana.

50

Si las unidades estructurales de sonda comprenden un anticuerpo, el anticuerpo puede seleccionarse de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo preferiblemente se une selectivamente a la especie diana.

55

En una realización, el primer y/o segundo sistema comprenden un electrodo de trabajo que tiene las unidades estructurales de sonda inmovilizadas sobre el mismo. En una realización, el primer y/o segundo sistema comprenden

una pluralidad de electrodos que tienen las unidades estructurales de sonda inmovilizadas sobre ellos. Cada uno de los sistemas primero y/o segundo puede comprender una pluralidad de electrodos, y la pluralidad de electrodos puede estar en una matriz. Cada uno de la pluralidad de electrodos es preferiblemente direccionable individualmente. "Direccionable individualmente" es un término conocido en la técnica y significa que cada electrodo de la matriz o estructura de electrodo puede conectarse eléctricamente a dispositivos externos por sí solo, es decir, sin la necesidad de conectar otros electrodos de la matriz al mismo tiempo. En una realización, la matriz puede ser capaz de detectar una pluralidad de especies diana. Por ejemplo, la matriz puede comprender una pluralidad de electrodos, cada uno de los cuales tiene moléculas de sonda en la misma, en donde las moléculas de sonda en al menos dos de la pluralidad de electrodos son capaces de unirse a diferentes especies diana entre sí.

10 Cada uno de los sistemas primero y/o segundo puede comprender una pluralidad de electrodos en una matriz. Preferiblemente, la matriz comprende al menos 10, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1,000, más preferiblemente al menos 10,000 electrodos, cada uno de los cuales puede ser direccionado individualmente.

15 Opcionalmente, en el primer sistema, una pluralidad de electrodos de trabajo están presentes, cada uno en contacto con un medio portador que contiene una especie diana en una concentración conocida, siendo el medio portador el mismo para cada electrodo de trabajo, pero la concentración de la especie diana en cada medio portador siendo diferente para cada electrodo de trabajo y las funciones de inmitancia y/o sus componentes se determinan para cada electrodo a una frecuencia preseleccionada de potencial o corriente aplicada. Esto permite la comparación de la variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con una variación en la concentración de la especie diana. Esto puede llevarse a cabo para una pluralidad de frecuencias para el potencial o la corriente aplicada para permitir la comparación de la variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con la variación en la concentración de la especie diana.

20 El método y otros aspectos de la invención son aplicables a electrodos de cualquier escala. En algunas realizaciones, es particularmente beneficioso para arreglos de pequeños electrodos. En algunas realizaciones, el primer y/o segundo sistema comprenden electrodos que tienen un diámetro (dimensión mayor) de no más de 50 μm , más preferiblemente no más de 20 μm , más preferiblemente no más de 1 μm , más preferiblemente no más de 500 nm, más preferiblemente no más de 200 nm, más preferiblemente no más de 50 nm. El diámetro en el presente contexto puede indicar la dimensión más grande, ya que los electrodos no siempre pueden asumir formas geométricamente reconocidas debido a las tolerancias de fabricación u otras consideraciones. Por lo tanto, para electrodos asimétricos o con forma de dedo u otras formas de electrodos, el "diámetro" puede interpretarse en consecuencia como "ancho" o "dimensión más grande", adecuadamente la dimensión más grande paralela al plano del sustrato en donde se encuentra el electrodo.

25 Los métodos de la presente invención se pueden aplicar a estructuras de electrodos o estructuras de matriz de electrodos donde los electrodos están muy separados, en particular, la distancia (separación) mínima entre los electrodos es preferiblemente menor que 100 μm , preferiblemente menor que 50 μm , más preferiblemente menor a 20 μm , más preferiblemente por debajo de 1 μm , más preferiblemente por debajo de 200 series y lo más preferiblemente por debajo de 50 nm.

30 El método se puede aplicar a estructuras de electrodos o estructuras de matriz de electrodos con una alta densidad de electrodos, que incluyen, entre otros, estructuras de electrodo o estructuras de matriz de electrodos con densidades de electrodo de preferiblemente 10/cm² o más, más preferiblemente de 100/cm² o más, más preferiblemente de más de 1000/cm² o más, más preferiblemente de más de 10000/cm². Los electrodos utilizados en el método de este documento, por ejemplo en el primer y/o segundo sistema, están formados por material eléctricamente conductor. Preferiblemente, estos materiales son metálicos, pero pueden ser, por ejemplo, no-metálicos, tales como materiales de carbono o semiconductores. Se prefieren oro, plata, platino, cobre o aluminio y, en particular, oro.

35 El primer y segundo sistema comprenderán típicamente un contraelectrodo, así como el electrodo de trabajo, que puede ser del mismo o diferente tipo de material que el contraelectrodo. Un electrodo de referencia también puede estar presente en el primer y/o segundo sistema. El potencial aplicado a, y la corriente monitorizada entre los electrodos de trabajo y los de contador se puede aplicar y controlar mediante un potenciostato, como entendería un experto.

40 Los aspectos de la presente invención se describirán ahora con referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos y las Figuras adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Aplicaciones de inmunoensayo: Superficies transductoras biofuncionalizadas y detección libre de etiqueta de marcadores de enfermedades

Metodología de espectroscopía de impedancia tradicional versus metodología de función de inmitancia

55 Como se mencionó anteriormente, la detección sensible de moléculas diana clínicamente importantes se puede lograr a través de la inmovilización de receptores apropiados en la superficie de un electrodo y el mapeo posterior de las características electrónicas o electroquímicas de esta interfaz en función de la unión del objetivo. Los presentes

inventores muestran aquí no solo que algunas funciones de inmitancia pueden ser sondas muy sensibles y calibrables de un objetivo, sino que también la mejor función de seguimiento depende en gran medida de la interfaz receptiva construida y del objetivo.

5 Las interfaces receptoras a objetivos específicos (por ejemplo, clínicamente importantes) se pueden generar al establecer combinaciones de químicas de superficie y receptores biológicos (la mayoría de las veces anticuerpos o aptámeros). En un análisis EIS, las características de impedancia de dichas interfaces se seleccionan como una función de la concentración del objetivo en la generación de curvas analíticas. Los presentes inventores comienzan aquí mostrando que los medios estándar para evaluar tales datos (es decir, mediante el uso de un circuito equivalente) no solo son innecesarios e inherentemente limitantes, sino también inferiores, incluso cuando la función de inmitancia que se está muestreando es la parte real de la función fundamental Z^* . Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich a menos que se indique. HS-C₁₁H₂₂-(EG)₃-OCH₂-COOH se adquirió de Prochimia Surfaces, Polonia. CRP fue comprado de MP Biomedicals. Anti-CRP (monoclonal, cabra) fue de AbDSerotec. Los electrodos de Au recién limpiados (mecánicamente y electroquímicamente) se sumergieron en una solución de tiol 2.5 mM (HS-C₁₁H₂₂-(EG)₃-OCH₂-COOH) en 200 μ l de etanol y se dejaron en funcionamiento durante 16 horas. El electrodo se lavó luego en etanol puro, luego en agua desionizada y se secó bajo nitrógeno. La inmovilización de anticuerpos se logró a través de la química de bioconjugación EDC/NHS estándar; se preparó una solución de 0.4 M EDC y 0.1 M de NHS y se añadió al electrodo activando los grupos carboxilo terminales en el tiol durante 30 min. La superficie se sumergió luego en 10 μ M del anticuerpo en PBS 10 mM, pH 7.4 y se dejó durante 1 hora. Finalmente, los ésteres de NHS restantes se desactivaron con una solución de etanolamina 1 M durante 5 minutos y la superficie se enjuagó a fondo en agua desionizada (18.2 M Ohm).

Se utilizó un potenciostato Autolab modelo PGSTAT12 con un módulo de impedancia FRA2, controlado por los programas GPES y FRA, para las mediciones electroquímicas. Se utilizó una configuración de tres electrodos para todas las mediciones, que consiste en un electrodo de trabajo de oro de 1.6 mm de diámetro (área de 0.02 cm²), un electrodo contador de malla de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl/3 M KCl. Las mediciones de EIS y VC (voltametría cíclica) se registraron en un electrolito hecho de 1 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} con un electrolito de soporte de PBS, pH 7.4. La VC se realizó a una velocidad de barrido de 100 mV S⁻¹ entre -0.1V y 0.5V en relación con Ag/AgCl. Las mediciones de EIS se realizaron en un rango de frecuencia de 50 mHz a 10 kHz en una solución de PBS que contiene 1 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} a un potencial fijo de 0.25 V, el potencial de reducción formal de la sonda en relación al electrodo de referencia utilizado, determinado por CV en el electrodo en blanco. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos de impedancia compleja generada (Z^*) se procesaron para obtener la parte imaginaria de la capacitancia según $Z^* = 1/j\omega C^*$, $C'' = \phi Z'$ and $C' = \phi Z''$, donde $\phi = (\omega|Z|^2)^{-1}$ y $|Z|$ es el módulo de Z^* . Los espectros de capacitancia se utilizaron para determinar la influencia de los parámetros de una sola capa en la resistencia de transferencia de carga, es decir, la influencia de la contribución capacitiva del SAM al proceso de transferencia de carga. Al representar la impedancia y la capacitancia complejas, se eliminó la influencia de la resistencia de la solución R_s . En el análisis de impedancia posterior, la capacitancia interfacial del electrodo modificado con SAM se modeló mediante dos capacitancias en serie, la de la monocapa (C_m) y la de doble capa (C_{dl}) donde $C_{dl} \gg C_m$ (lo que significa C_m domina en los análisis). La monocapa está, además, configurada con un término de polarización asociado compuesto de contribuciones R_t y C_t (en el formalismo de Debye o Cole-Cole). Este proceso de carga y su escala de tiempo asociada se resuelven directamente en el régimen de dominio de frecuencia de capacitancia compleja y su consideración dentro del modelo de circuito equivalente utilizado. La Figura 5 proporciona un análisis más preciso de la interfaz.

Entre cada medición, el electrodo se regeneró con una solución de glicina/HCl 1 M a pH 2.5 o NaOH 6 mM en H₂O con EtOH al 0.6% para eliminar todas las interacciones no-covalentes y se lavó con PBS. Se usó BSA como control negativo para garantizar que la interfaz no fuera receptiva a proteínas no-específicas. La Figura 3 muestra gráficos de datos de Nyquist superpuestos para una interfaz de anticuerpo anti-CRP preparada a diferentes concentraciones de la meta de CRP. La gráfica muestra que la impedancia compleja, Z^* , responde al objetivo en un rango de concentraciones y frecuencias. Todos los valores que se muestran aquí son valores medios adquiridos a partir de mediciones de tres electrodos diferentes. En particular, la Figura 3 muestra la respuesta de una interfaz receptiva a la unión de un objetivo clínicamente importante, la Proteína Reactiva C (CRP). Es evidente, como se esperaba, que la unión del objetivo está asociada con un aumento de la impedancia. El grado en que las componentes Z' o Z'' cambian depende de la frecuencia de muestreo experimental.

La Figura 4A (Izquierda) muestra la resistencia de transferencia de carga R_{ct} representada en función de la concentración del objetivo en una escala logarítmica para la interfaz I (valores obtenidos de un ajuste de valores medios obtenidos de tres conjuntos de datos de impedancia independientes; las barras de error representan errores asociados con ajustes de impedancia a un modelo de circuito equivalente). La Figura 4B (Derecha) muestra la varianza de la parte real de la impedancia con log de concentración de diana; (datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, donde R_{ct} and Z' están más correlacionados). Ambos parámetros son capaces de proporcionar una buena dependencia en función de la concentración del objetivo, pero Z' se obtiene con un 10% menos de error y sin necesidad de un procedimiento de ajuste. La dependencia lineal del coeficiente de Pearson es > 96% en ambos casos, y 98% para la parte real de la impedancia en esta frecuencia. Las variaciones de las funciones son de ~25% en un rango diana de 250 nM CRP.

La aplicación de un ajuste de circuito equivalente "Randles" estándar a Z^* muestreado permite la resolución de la resistencia de transferencia de carga R_{ct} en función de la presencia de CRP diana, como se muestra en la Figura 4A. Aunque es evidente que R_{ct} muestra una respuesta adecuada al objetivo y puede usarse en la generación de una curva analítica, su ajuste lineal está asociado con un error significativo (~10%). Significativamente, se puede generar una curva analítica equivalente, a partir de los mismos datos sin procesar, a partir de cualquiera de las funciones de inmitancia. En la Figura 4B (derecha), una curva analítica se presenta con Z' (obtenida sin el supuesto previo de la aplicación de un "circuito equivalente") y notablemente la presencia del objetivo con mayor precisión que el parámetro R_{ct} obtenido clásicamente.

La ventaja de muestrear la función compleja Z^* y su componente real derivado Z' y no recurrir al uso de un circuito equivalente en estos ensayos se muestra de nuevo en un ensayo de unión a CRP con una superficie receptiva diferente en la Figura 5 donde, nuevamente, el ajuste de R_{ct} , derivado de la aplicación de un presunto circuito equivalente, ha asociado un mayor error de ajuste.

La Figura 5A (Izquierda) muestra R_{ct} representada contra la concentración del objetivo en una escala logarítmica para una interfaz de enlace CRP alternativa (valores obtenidos de un ajuste de los valores medios obtenidos de tres conjuntos de datos de impedancia independientes; las barras de error representan errores asociados con ajustes de impedancia a un modelo de circuito equivalente). La Figura 5B (Derecha) muestra la varianza de la parte real de la impedancia con log de concentración de diana; datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 0.1 Hz, donde R_{ct} y Z' están más correlacionados). La dependencia de ambos parámetros es equivalente a dentro del 10%. La dependencia lineal del coeficiente de Pearson es > 96% en ambos casos, y 98% para la parte real de la impedancia en esta frecuencia. Las variaciones de las funciones son de ~50% en un rango diana de 250 nM CRP.

Al extender esta metodología a una gama más amplia de funciones de inmitancia, los presentes inventores encontraron que, para cualquier interfaz dada, algunas funciones son mejores para informar sobre el cambio interfacial específico (como la unión de una molécula diana) que otras. Para la interfaz receptiva de CRP que se mostró anteriormente que se puede calibrar con la función Z' , por ejemplo, se observa que la función C' no informa sobre el analito de manera sensible o calibrable. Debido a que el método usó un tratamiento factorial de datos en bruto sin suposiciones previas sobre la superficie o cambios inducidos, por ejemplo, por un evento de enlace específico, su aplicación es independiente de la interfaz específica utilizada (el electrodo, la química de la superficie, la química biológica, etc.).

La Figura 6 ilustra la varianza de la parte real de la capacitancia con la concentración de CRP para una interfaz receptiva; los datos obtenidos a una frecuencia de muestreo de 1 Hz, donde R_{ct} y Z' están más correlacionados como se muestra en la Figura 8. Las variaciones de las funciones son ~14% en un rango diana de 250 nM CRP. Curva analítica de Y'' frente a la concentración logarítmica objetivo. Las variaciones son de aproximadamente 45% en el mismo rango de concentración del objetivo.

Por otro lado, se observa que el término imaginario de función compleja Y^* es altamente sensible (Figura 6).

Un resumen de las sensibilidades en un rango de funciones de inmitancia se muestra en las Tablas II y III a continuación para dos interfaces receptoras diferentes preparadas para el mismo objetivo (una basada en un anticuerpo, la otra en un aptámero peptídico), donde la variación, tanto con desempeño funcional como con película receptiva, es digno de mención.

Tabla II. Variaciones de las funciones a través del rango diana de CRP de 250 nM para la interfaz receptiva de anticuerpos. La función de relación C''/C' se explicará más adelante.

Función de Inmitancia	Componente	Sensibilidad	Rango diana	Dependencia logarítmica
Z^*	Z'	~25%	250 nM	Sí
Y^*	Y''	~22%	250 nM	Sí
C^*	C'	~7%	250 nM	Sí
--	ϕ	~3%	250 nM	Sí
C^*	C''/C'	~6%	250 nM	No

Tabla III. Variaciones de las funciones en un rango diana de CRP de 250 nM para una interfaz no receptora de anticuerpos.

Función de Inmitancia	Componente	Sensibilidad	Rango diana	Dependencia logarítmica
Z^*	Z'	~50%	250 nM	Sí
Y^*	Y''	~45%	250 nM	Sí
C^*	C'	~14%	250 nM	Sí
-	φ	~7%	250 nM	Sí
C^*	C''/C'	~12%	250 nM	No

Finalmente, se ha sugerido previamente (Ko Ferrigno et al. Patente de Estados Unidos 2010/0234234 A1) a partir de ensayos EIS completamente estándar (basados solo en la función Z^* y el posterior análisis del circuito equivalente) que el desplazamiento de fase entre la V aplicada y la medida puede servir como una buena función sensorial. Para las interfaces receptivas con las que se está ejemplificando aquí, es evidente que este no es el caso y, de hecho, la variación de fase (~7%) se excede en gran medida (de una manera más calibrable) en magnitud por la capacidad de respuesta de muchas de las otras funciones de inmitancia que se pueden muestrear.

La Figura 7 ilustra los cambios de fase para la interfaz de aptámero en función de la concentración del objetivo a 1 Hz.

En resumen, está claro que la capacidad de muestrear un rango de funciones de inmitancia es poderosa para maximizar la capacidad de la persona experta para muestrear cambios interfaciales sensibles en un electrodo de trabajo, donde algunos rastrean los cambios deseados de manera sensible y reproducible y calibrable, mientras que otros no lo hacen y, de hecho, al extender esta capacidad a través de una amplia gama de interfaces.

Potencialmente podríamos agregar más gráficos de función de inmitancia aquí, con diferentes receptores u objetivos, algunos son notablemente más sensibles que otros.

15 Ampliación del rango analítico.

Es probable que diferentes funciones de inmitancia respondan a los procesos de enlace de destino en una interfaz preparada adecuada con diferentes niveles de sensibilidad. Puede ser el caso, por ejemplo, de que una función comience a responder de manera calibrable en niveles u objetivos extremadamente bajos y luego se sature y se vuelva, a partir de entonces, que no responda. En este punto, se puede muestrear adicionalmente la unión del objetivo (en niveles más altos de concentración del objetivo) utilizando diferentes funciones de inmitancia. De esta manera se amplía el rango analítico del experimento.

Debido a que el procedimiento experimental se basa en la aplicación de una traza de voltaje de CA, la frecuencia de la aplicación de voltaje forma otro parámetro experimental altamente ajustable. A continuación se muestra que la frecuencia de muestreo tiene un efecto profundo en el grado en que las funciones responden.

25 En una realización, diferentes funciones de inmitancia, componentes de las mismas, o relaciones de las mismas se seleccionan en la etapa (i) del método y se usan, en la etapa (ii), para diferentes rangos del parámetro de interés.

El uso de funciones de ratio

30 Cualquier proporción de partes reales e imaginarias dentro de las mismas o diferentes funciones de inmitancia constituye una función independiente del tamaño físico o área de la superficie de ensayo, es decir, una propiedad intensiva. Significativo en esto es el hecho de que la función analítica de relación debería ser mucho menos dependiente de las variables de fabricación (como las inherentes a la generación de múltiplos de electrodos de ensayo individuales o matrices de electrodos). Esto puede reducir drásticamente la variación lote a lotes y los coeficientes de variación.

35 Por consiguiente, en una realización del método, en la etapa (i), se selecciona una proporción de funciones de inmitancia o componentes de la misma o diferentes funciones de inmitancia, para uso en la prueba electroquímica de la etapa (ii); y, opcionalmente, la proporción es de las partes reales e imaginarias de la misma función de inmitancia, o componentes, por ejemplo, partes reales e imaginarias, de diferentes funciones de inmitancia; opcionalmente, se seleccionan las mismas o diferentes funciones de impedancia de una función de transferencia de impedancia compleja, una función de admitancia compleja, una función de transferencia de módulo complejo, una función de transferencia de constante dieléctrica compleja, una función de transferencia de capacitancia compleja, una función de transferencia de conductancia compleja.

Optimización automática de frecuencia

Como se explicó anteriormente, la respuesta de cualquier función de inmitancia a la frecuencia de muestreo se puede resumir en un gráfico de Bode. Como es evidente en la Figura 8, la frecuencia de muestreo óptima depende no solo de la función de inmitancia utilizada, sino también de la construcción específica y las características químicas de la interfaz. En la Figura 8A, por ejemplo, es evidente que 1 Hz es la mejor frecuencia para rastrear la unión del objetivo en algún electrodo modificado en la construcción de una curva analítica basada en Z' . En una interfaz igual y selectivamente receptiva al mismo objetivo pero preparada con un receptor diferente, la frecuencia óptima es de 0.1 Hz (Figura 8B).

La Figura 8A muestra diagramas de impedancia compleja de Bode superpuestos de una interfaz receptiva de CRP a diferentes concentraciones de diana. La frecuencia de muestreo óptima (a partir de la cual se pueden generar las curvas analíticas) es 1 Hz aquí. Para una interfaz de respuesta CRP diferente, la frecuencia óptima es de 0.1 Hz (derecha).

La frecuencia de muestreo óptima se puede obtener para cualquier combinación de función de inmitancia, interfaz y destino a través de un procedimiento de software automatizado. Una vez que esto se ha establecido, los análisis solo deben realizarse en esa frecuencia específica (optimizada).

Uso de relaciones entre los componentes de las funciones de inmitancia.

Los métodos descritos anteriormente no se limitan solo a la matriz de funciones enumeradas en la Tabla I, sino que también pueden extrapolarse a combinaciones casi "ilimitadas" de funciones de inmitancia o términos derivados reales e imaginarios. Por ejemplo, aunque se muestra que los componentes reales e imaginarios (no mostrados) de la función de transferencia C^* no responden en gran medida al objetivo específico de CRP en las interfaces sensoriales mencionadas anteriormente (Tabla II y III), las combinaciones de C'' y C' , conocida como función $\tan \delta$, puede ser utilizada de manera efectiva y sensible (véase Figura 9). Además, es de destacar que, al usar las relaciones de función de esta manera, la concentración del objetivo se mapea de manera lineal, en oposición a logarítmica.

La Figura 9 muestra la curva analítica lineal del valor máximo de la función de relación C''/C' en función de relación $frente$ a concentración del objetivo. La dependencia lineal del coeficiente de Pearson es $> 98\%$. Nótese también que la relación de C''/C' no tiene unidad física y una interpretación física de esta relación no es necesaria en su utilización. Las variaciones de las funciones son $\sim 12\%$ en un rango diana de 250 nM CRP.

En resumen, el enfoque de la función de inmitancia como se describió anteriormente proporciona a los usuarios un vasto arsenal potencialmente automatizado (software) con el cual probar cambios interfaciales como los generados por la unión de objetivos en superficies receptoras adecuadas. De la biblioteca de curvas analíticas generadas, se encontrará que algunas son sondas más sensibles y confiables que otras o más adecuadas para rangos de concentración específicos. Al habilitar un muestreo de una biblioteca de funciones de inmitancia, este envío enseña la capacidad de muestrear poderosamente superficies de electrodos (y, por lo tanto, detectarlas) sin ninguna suposición previa por parte del usuario final.

Ejemplo 2 - Novedoso análisis bioelectroquímico usando funciones de inmitancia

La capacidad de intercambiar electrones con los sitios activos redox de proteínas y enzimas no solo ha arrojado luz sobre los procesos fundamentales de mantenimiento de la vida, sino que también se aplica poderosamente en la generación de biosensores derivados basados en enzimas. El biosensor de glucosa es un ejemplo específico y altamente exitoso.

Los presentes inventores muestran aquí que la compleja función de la capacidad de inmitancia también se puede utilizar directamente después de eventos electroquímicos (es decir, la transferencia de electrones entre las biomoléculas inmovilizadas en la superficie y la superficie del electrodo subyacente) con una definición excepcionalmente alta. Esto es especialmente poderoso en la bioelectrónica donde las señales faradaicas (de proteínas o enzimas inmovilizadas) pueden ser bajas y difíciles de resolver por métodos electroquímicos estándar. En tales interfaces, la inmovilización es comúnmente en una monocapa intermedia (de soporte) autoensamblada. Ejemplificada aquí con la proteína azurina, la metodología es igualmente aplicable a cualquier sistema bioelectrónico inmovilizado de superficie. Al analizar la magnitud de esta función a medida que se barre el potencial de superficie del electrodo, se tiene acceso directo a una determinación del potencial de media onda electroquímica, cinética de transferencia de electrones y una cuantificación de la densidad molecular presente.

El 1-hexanotiol, el 1-octanotiol, el 1-decanotiol y el 1-dodecanotiol se compraron a Sigma-Aldrich. El 11-ferrocenil-1-undecanotiol se adquirió de Dojindo Molecular Technologies, Japón. Todos fueron utilizados sin modificaciones adicionales. Las sales de tetrabutilamonio (perclorato, hexafluorofosfato), etanol, diclorometano y acetonitrilo puros para HPLC se utilizaron como se recibieron (*Sigma*). La azurina de *Pseudomonas aeruginosa* fue donada amablemente por el grupo del Prof. Canters (Leiden University, NL). Todas las soluciones se prepararon en agua MilliQ agua (18.2 M Ω). Los electrodos de disco de oro policristalino (GDE) (Cypress Gold, diámetro 1 mm) se limpiaron mediante pulido mecánico y electroquímico y se sumergieron en soluciones de tior 1 mM en etanol puro para HPLC (durante la noche, a temperatura ambiente). Los electrodos se enjuagaron con etanol y agua y se secaron bajo nitrógeno. La fisisorción

de azurina sobre superficies de SAM hidrofóbicas (hexanotiol, octanotiol, decanotiol, dodecanotiol) se obtuvo depositando durante 30 minutos. una alícuota de 5 μ l de proteína 0.5 mM en un regulador MES 20 mM a pH 7.0. Los electrodos así modificados se enjuagaron copiosamente con regulador y se sumergieron en la celda electroquímica para su análisis.

- 5 Se realizaron mediciones de Voltametría Cíclica (VC) y de impedancia utilizando un Autolabpotentiostat GSTAT20 (Ecochemie NL) equipado con un módulo ADC750 y un ARF (análisis de respuesta de frecuencia). Los voltamogramas cíclicos se adquirieron solo con el propósito de realizar comparaciones entre las dos metodologías. También se realizaron barridos de VC individuales para predefinir las ventanas faradaicas antes del análisis EIS (requerido solo si no se conocen los potenciales rédox antes). Las frecuencias de CA para los experimentos de impedancia oscilaron entre 1 MHz y 10 mHz, con una amplitud de 10 mV. La función compleja $Z^*(\omega)$ (impedancia) se convirtió en $C^*(\omega)$ (capacitancia) a través de la definición física $Z^*(\omega) = 1/j\omega C^*(\omega)$ en la que ω es la frecuencia angular. Los CV y las exploraciones de EIS se midieron en 5 mL, una celda de un compartimento, que contiene el GDE, una referencia de calomel saturada (SCE) y una gasa de platino como contraelectrodo. Como electrolito de soporte, se usaron NaClO_4 200 mM y MES 5 mM, regulados a pH 5.0 con NaOH. Todas las soluciones utilizadas para la electroquímica se desoxigenaron burbujeando con argón ultrapuro y purgando la superficie del electrolito durante la duración del experimento. Los datos de impedancia se adquirieron a potenciales fijos de -200 mV y 90 mV *frente* a SCE, con frecuencias de modulación que se variaron en 80 pasos de 0.1 mHz a 10 MHz.

- 20 Primero se muestra que la respuesta de impedancia de tales interfaces bioelectrónicas es insensible al potencial del electrodo (véase Figuras 10A y 10B). Las Figuras 10A muestran la energía potencial superpuesta de la impedancia real de complejo de Bode y la Figura 10B muestra diagramas imaginarios de una película de proteína electroactiva en un electrodo de oro modificado con SAM que muestra una dependencia potencial que es despreciable.

Las Figuras 11A y 11B muestran los complejos capacitivos de Bode superpuestos (componente real, en la Figura 11A, componente imaginario en la Figura 11B) de una película de proteína electroactiva azurina en función de la energía potencial electroquímica (es decir, de -100 mV *frente* al electrodo de referencia SCE a 250 mV).

- 25 En particular, si se analiza la función de inmitancia compleja, C^* (y posteriormente sus componentes reales e imaginarios) como una función de potencial, resuelve los cambios marcados con el potencial de superficie (Figura 11) en un amplio rango de frecuencias de muestreo. La impedancia compleja derivada de la función de la función, entonces, informa sensiblemente sobre el proceso de transferencia de electrones. En ausencia de la electroquímica, esta dependencia desaparece. El uso de la función de inmitancia C^* para estudiar electroquímica de esta manera no tiene precedentes. Si uno analiza esta "capacitancia rédox" (etiquetada como Cr aquí) como una función del potencial del electrodo con más detalle, el grado al que se informa sobre la electroquímica es claro (Figura 12). Se observa una dependencia Gaussiana del potencial, con Cr máximo en el potencial electroquímico reversible. El área bajo esta curva informa directamente la cantidad de material electroquímicamente activo abordado por el electrodo.

- 35 La Figura 12 muestra una gráfica de la capacitancia rédox (C_r) *frente* al potencial de una película de proteína electroquímicamente activa. La gráfica se centra en cero aquí por conveniencia.

En conclusión, los presentes inventores han mostrado una nueva forma de comunicarse con películas electroactivas. Aunque se ejemplifica con una película de proteína rédox (donde las ventajas de la señal: el ruido es particularmente ventajoso), la metodología es igualmente aplicable a cualquier película electroactiva y permite una resolución fácil de potencial reversible, cinética de transferencia de electrones y cobertura molecular.

40 **Ejemplo 3 – Extensión del rango lineal**

Los presentes inventores consideran que hay un gran valor en la extensión del rango analítico lineal que, por defecto, ofrece un ensayo. Examinaron, mediante el uso de múltiples funciones analíticas, el potencial de extender el rango lineal con cualquier superficie receptiva única dada (de una afinidad fija de unión receptor-diana). Esto se ilustra en las Figuras 15 y 16, respectivamente (utilizando una IF y 3 IF, respectivamente).

- 45 La Figura 15 muestra una gráfica de M^*/C^* frente a autoanticuerpo alfa-sinucleína enriquecido en un 50% de suero sanguíneo.

La Figura 16 muestra una gráfica de combinación de Z^*/C^* , M^*/C^* y M^*/Y^* frente a autoanticuerpo alfa-sinucleína enriquecido en suero sanguíneo al 50%.

Detalles experimentales para el Ejemplo 3

- 50 Las interfaces receptoras se generaron a través de la modificación covalente de una monocapa autoensamblada de polietilenglicol (PEG) tiol HS-C11-(EG)3-OCH₂-COOH (Prochimia Surfaces, Polonia) con alfa-sinucleína humana recombinante (expresada en *E. coli* y se purificó como se describió anteriormente (véase V. N. Uversky, J Biomol Struct Dyn, 2003, 21, 211-234). La modificación covalente se logró mediante el uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (adquirida en Sigma Aldrich). Se obtuvo agua ultrapura (18.2 M Ω /cm) de un sistema Milli-Q y se usó en todo el proceso. Se preparó solución salina regulada con fosfato (PBS, 10 mM) con Tween-20 (PBST, 10 mM, pH 7.4) disolviendo tabletas de PBS (Sigma Aldrich) en agua con Tween-20 al 0.2%

- v/v, y se filtró utilizando una solución de 0.22 μm filtro de membrana. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico. Los experimentos electroquímicos se realizaron con un Autolab Potentiostat 12 equipado con un módulo FRA2 (Metrohm Autolab B.V.). Se usó un sistema convencional de tres electrodos con un electrodo de trabajo de disco de oro (1.6 mm de diámetro, BASi), un contraelectrodo de alambre de platino y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, relleno con 1.0 M KCl) (instrumentos CH). Todos los potenciales se informan en relación con esta referencia. Los espectros de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se registraron en el rango de frecuencia de 0.05 Hz a 10 kHz. La amplitud del potencial de onda sinusoidal aplicada fue de 10 mV con el potencial de corriente directa establecido en 0.25 V (el E_0 de la sonda redox utilizada, 1.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). El anticuerpo alfa-sinucleína puro se añadió al suero diluido comercialmente disponible (Sigma Aldrich) diluido al 50% (con PBST (10 mM, pH 7.4) a lo largo de un rango amplio y cuantificado (0.1 nM-1200 nM). Los electrodos modificados del receptor se incubaron luego en estas soluciones que además contenían 1.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a temperatura ambiente durante 20 minutos, y las respuestas EIS se registraron en la misma solución de incubación. Para evaluar inicialmente la selectividad interfacial, se utilizó BSA y se midió de manera similar.
- Los biosensores usados se regeneraron utilizando una celda de flujo (1 mL de volumen con un caudal de 3 mL/min) con glicina/HCl 0.5 M durante 10 minutos antes del lavado con PBST. Los datos de las funciones M'' , C'' , Z'' e Y'' se adquirieron a partir de datos sin procesar como se detalla anteriormente. Todos los puntos de datos representados en las Figuras 15 y 16 son los medios de repeticiones en 3 electrodos receptores diferentes a esa concentración del objetivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de prueba electroquímica que comprende
 - (i) comparar cómo una pluralidad de funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés para un primer sistema, y luego seleccionar una función de inmitancia o un componente de la misma para usar en una prueba electroquímica;
 - (ii) realizar un paso de prueba electroquímica para un segundo sistema para determinar al menos un valor para la función de inmitancia o componente de la misma seleccionado en el paso (i), y luego, utilizando una relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés, determinar un valor en el parámetro de interés,
- en donde el primer sistema proporciona un sistema adecuado para calibrar el parámetro de interés para el segundo sistema.
2. El método de prueba electroquímica de la reivindicación 1, en donde el método comprende antes de la etapa de comparación (i), determinar para el primer sistema cómo la pluralidad de funciones de inmitancia y / o sus componentes varían con un cambio en un parámetro de interés y determinar la relación cuantitativa entre la función de inmitancia seleccionada y el parámetro de interés.
3. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el parámetro de interés es la concentración de una especie diana en un medio portador.
4. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las funciones de inmitancia se seleccionan de una función de transferencia de impedancia compleja, una función de admitancia compleja, una función de transferencia de módulo complejo, una función de transferencia de constante dieléctrica compleja, una función de transferencia de capacitancia compleja, una función de transferencia de conductancia compleja, y combinaciones de los mismos.
5. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método implica, antes de la etapa de comparación (i), determinar una pluralidad de funciones de inmitancia para el primer sistema, derivando al menos un componente para cada función de inmitancia y, al comparar el paso (i) comparando cómo el al menos un componente para cada función de inmitancia varía con un cambio en el parámetro de interés para el primer sistema.
6. El método de prueba electroquímica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos un componente de cada función de inmitancia se selecciona de la parte real de la función de inmitancia, la parte imaginaria de la función de inmitancia, la amplitud de una función de inmitancia y la fase de la función de la inmitancia.
7. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método implica determinar una primera función de inmitancia para el primer sistema, que es una función de inmitancia de impedancia, determinar una o más segundas funciones de inmitancia distintas a una función de inmitancia de impedancia para el primer sistema, y luego determinar cómo la primera y una o más segundas funciones de inmitancia y/o sus componentes varían con el parámetro de interés.
8. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la comparación implica (i) comparar el grado de variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con el cambio en el parámetro de interés y/o (ii) comparar la correlación de la variación de las funciones de inmitancia y/o sus componentes con el parámetro de interés.
9. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la determinación implica trazar un componente de cada función de inmitancia contra la concentración de una especie en un medio portador en el primer sistema o el logaritmo de la concentración de una especie en un medio portador en el primer sistema.
10. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la selección de la función de inmitancia o su componente para su uso en una prueba electroquímica se selecciona de
 - (i) seleccionar una función de inmitancia que tenga la mayor variación con la cantidad de cambio en el parámetro de interés;
 - (ii) seleccionar una función de inmitancia que tenga la mayor correlación con el parámetro de interés;
 - (iii) seleccionar una función de inmitancia con una variación con la cantidad de cambio en el parámetro de interés sobre un umbral preseleccionado y/o
 - (iv) seleccionar una función de inmitancia que tenga una correlación con el parámetro de interés sobre un umbral preseleccionado; o una combinación de los mismos.
11. El método de prueba electroquímica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde diferentes funciones de inmitancia, componentes de las mismas, o relaciones de las mismas se seleccionan en la etapa (i) del método y se usan, en la etapa (ii) para diferentes rangos del parámetro de interés.

12. Un aparato para uso en un método de prueba electroquímica, en donde el aparato está adaptado para llevar a cabo el método electroquímico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

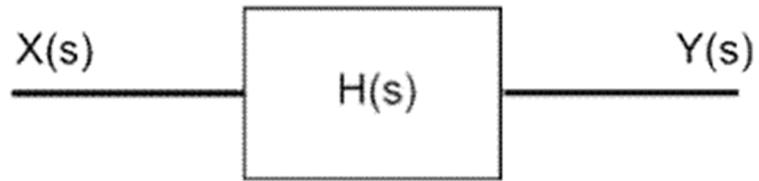


Fig. 1

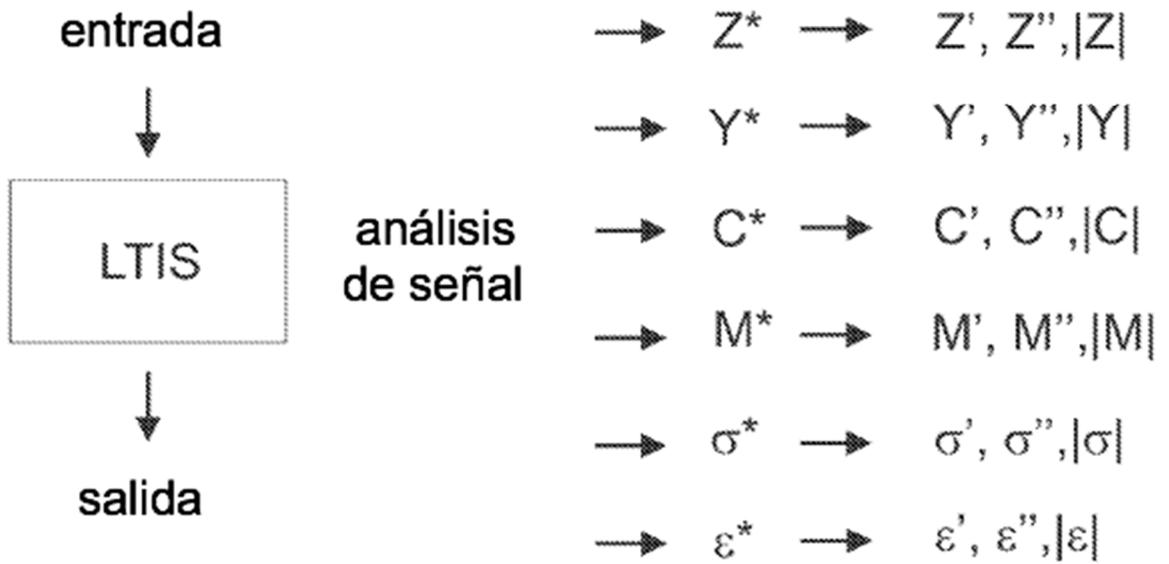


Fig. 2

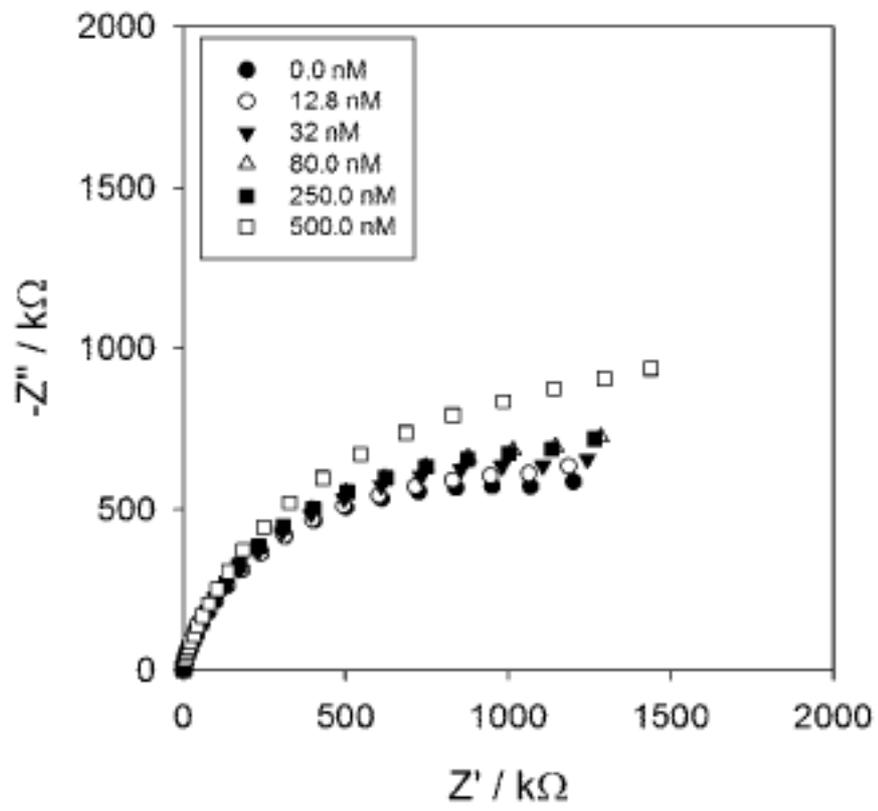


Fig. 3

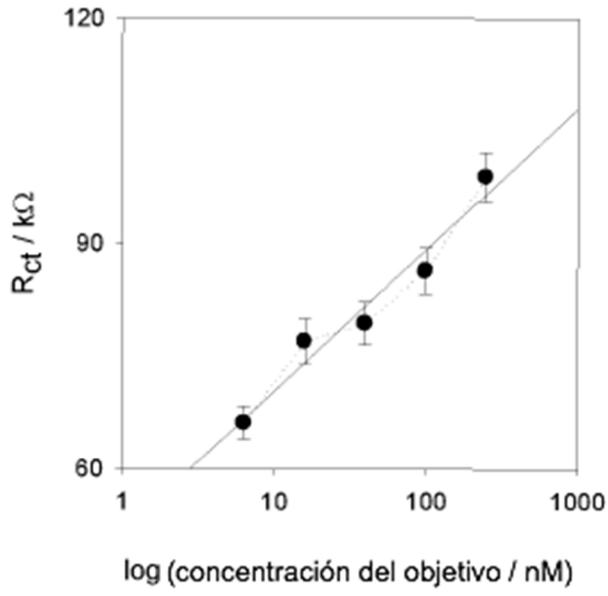


Fig. 4A

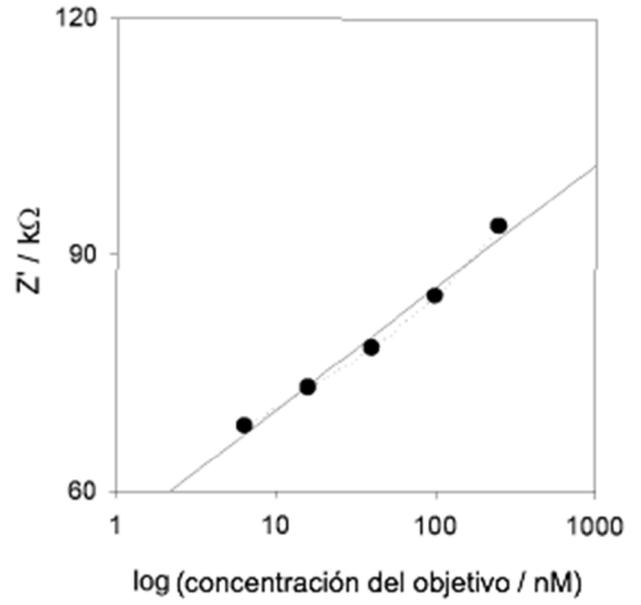


Fig. 4B

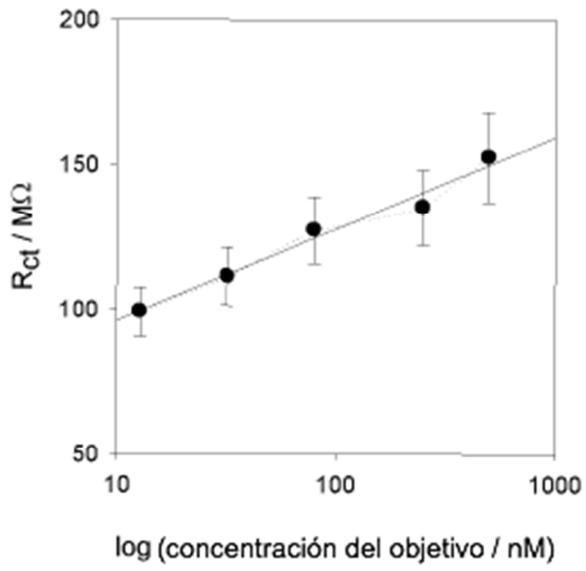


Fig. 5A

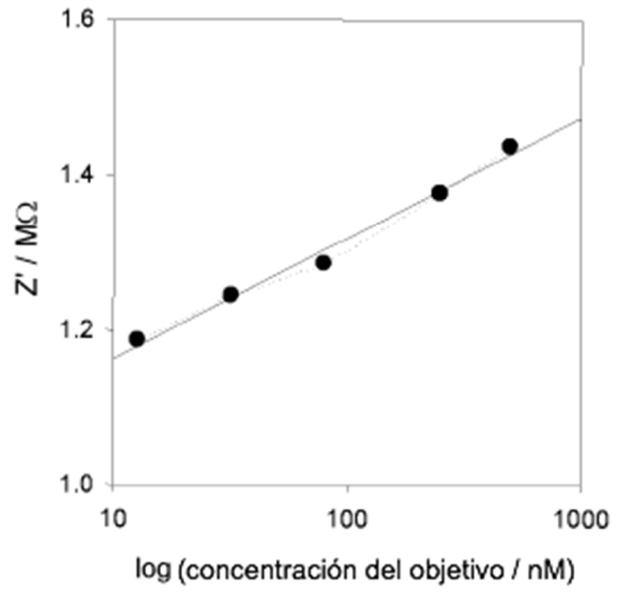


Fig. 5B

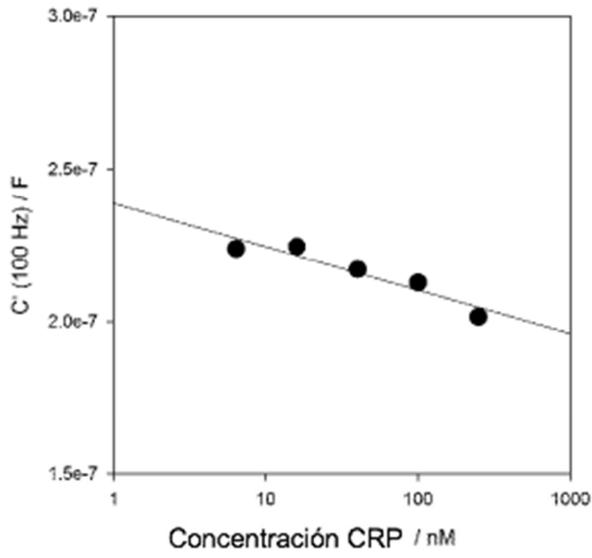


Fig. 6A

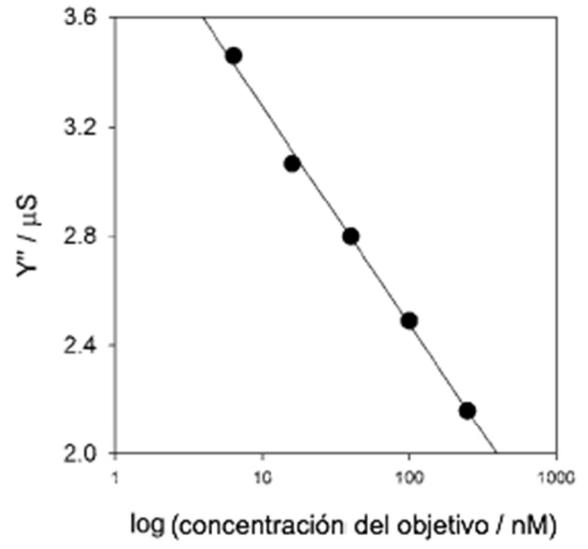


Fig. 6B

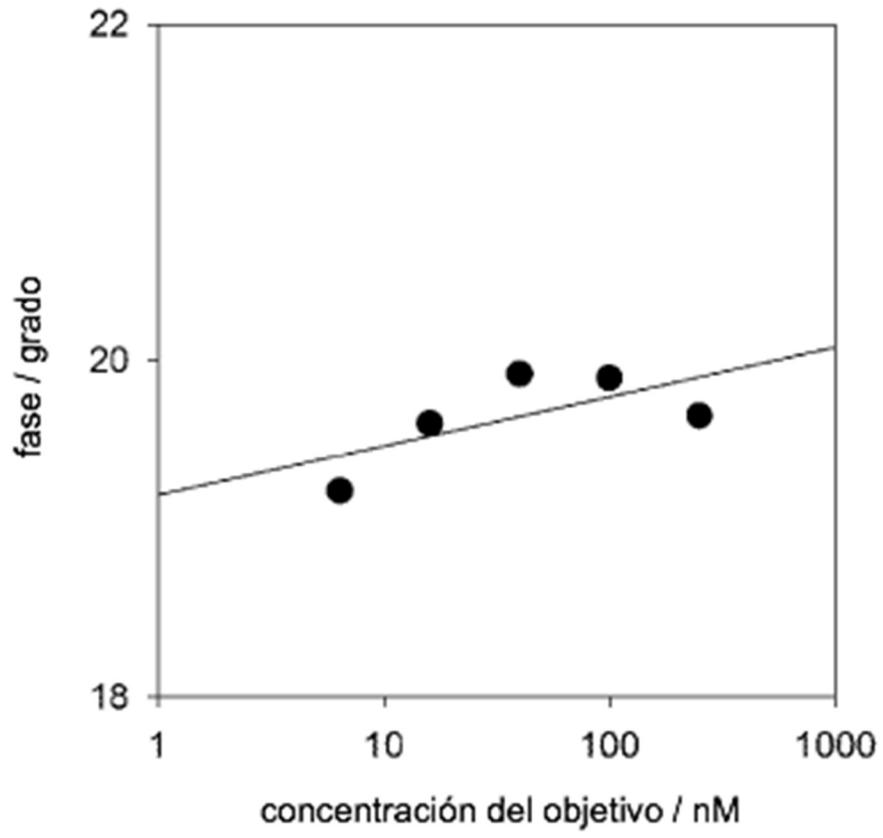


Fig. 7

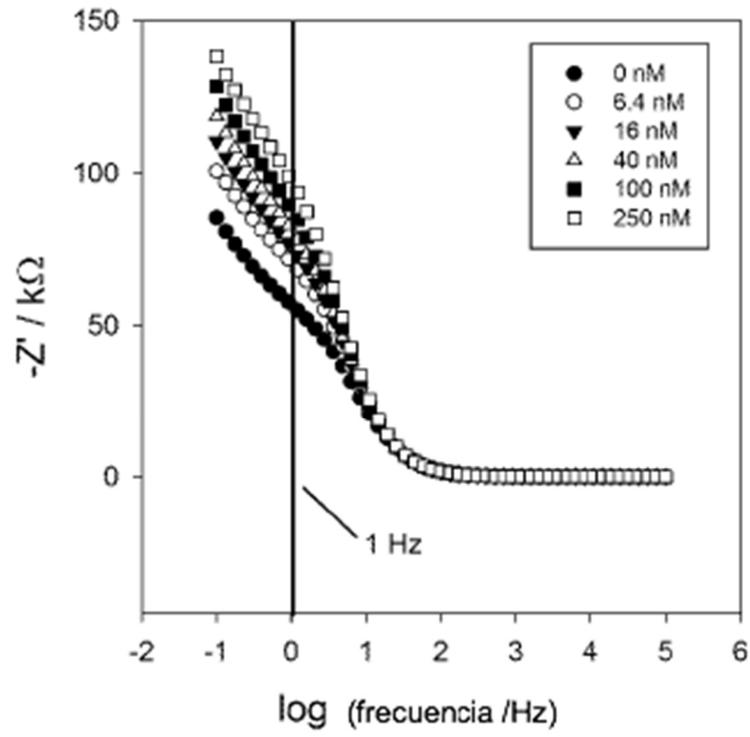


Fig. 8A

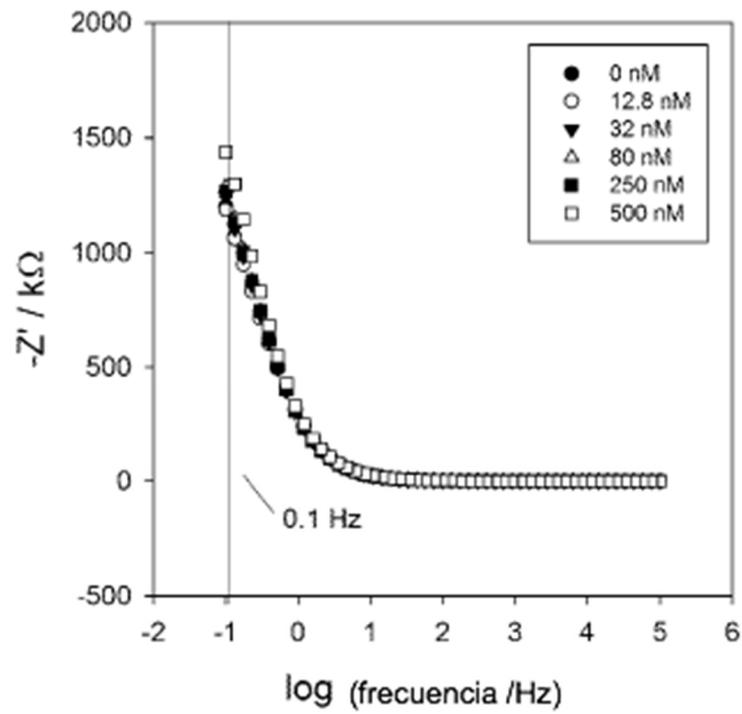


Fig. 8B

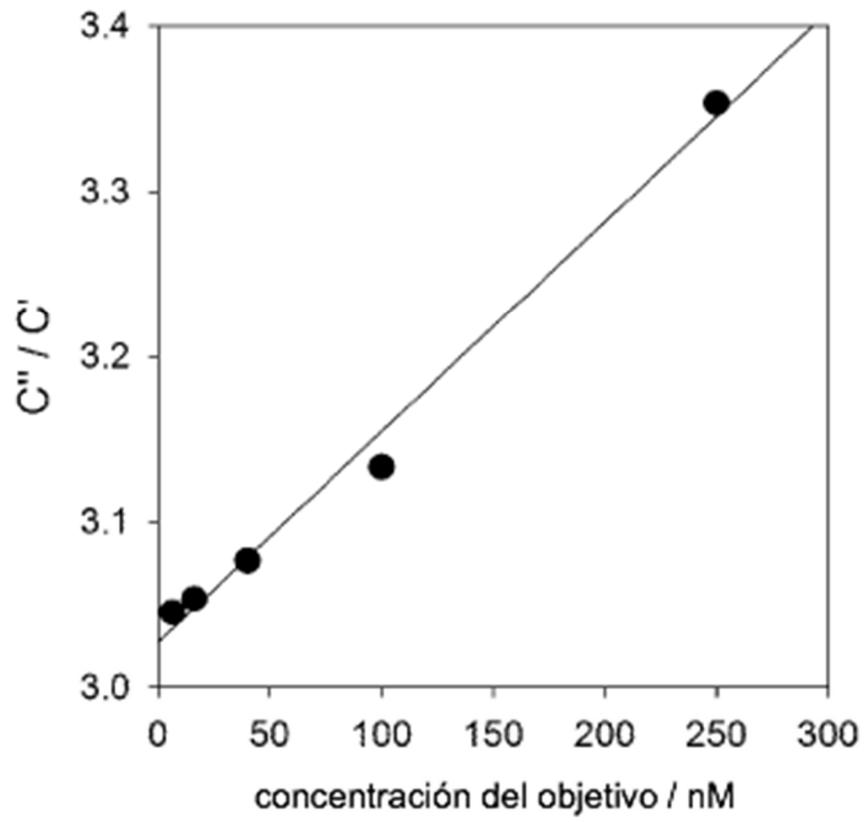


Fig. 9

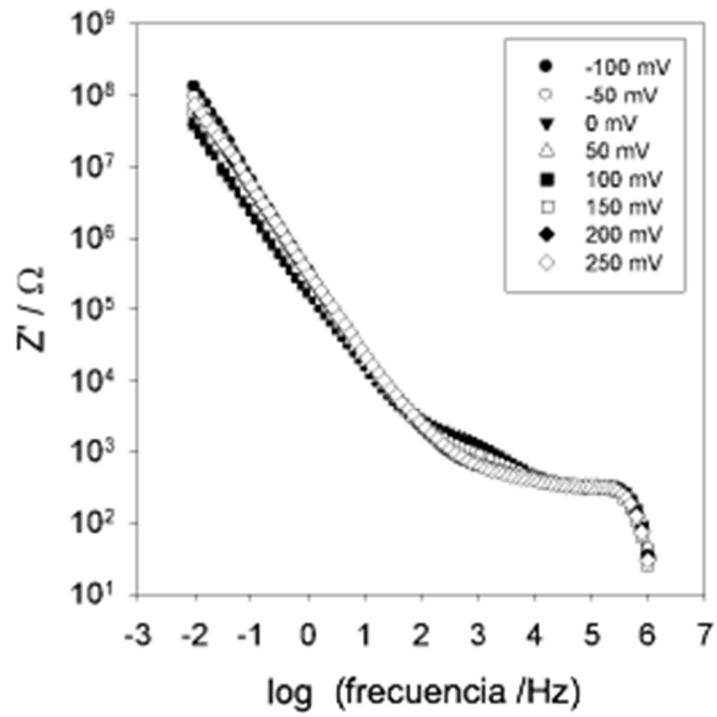


Fig. 10A

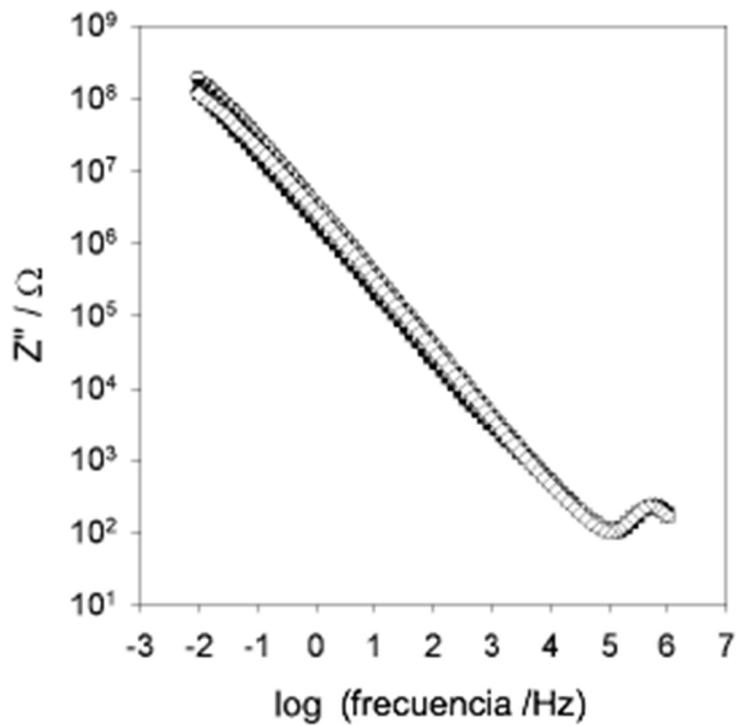


Fig. 10B

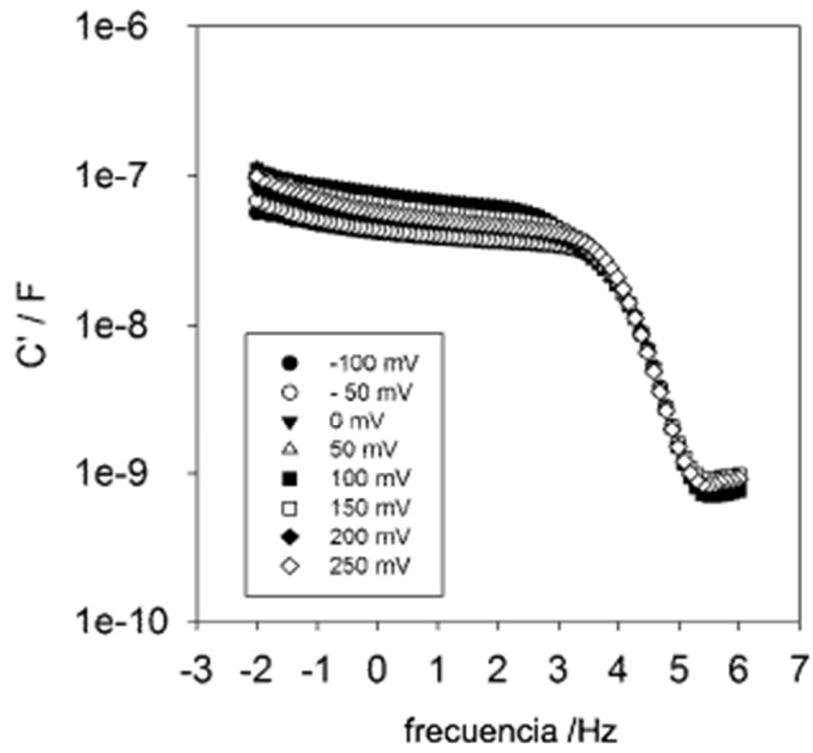


Fig. 11A

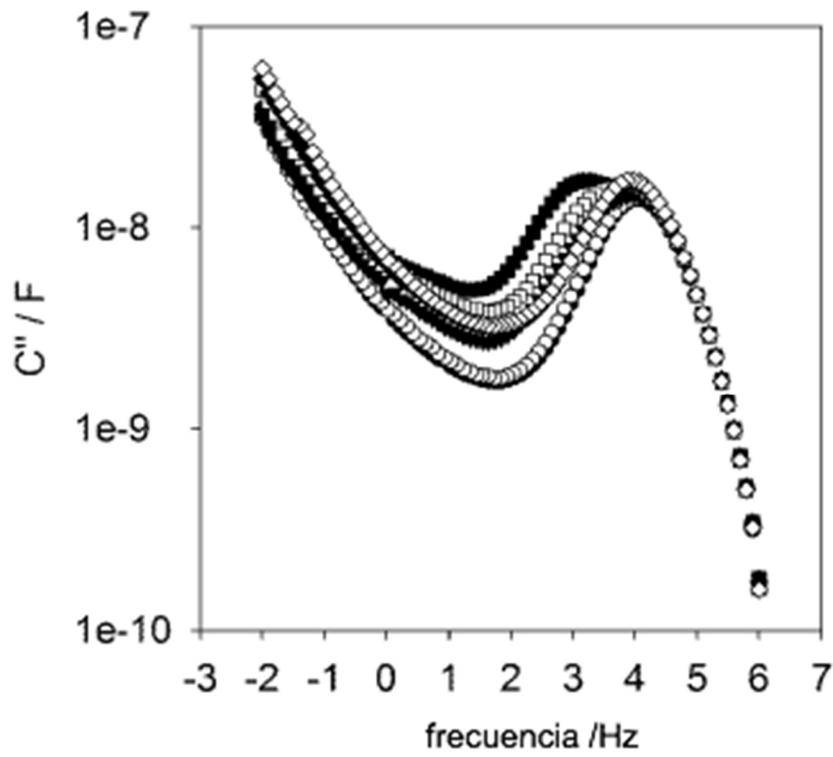


Fig. 11B

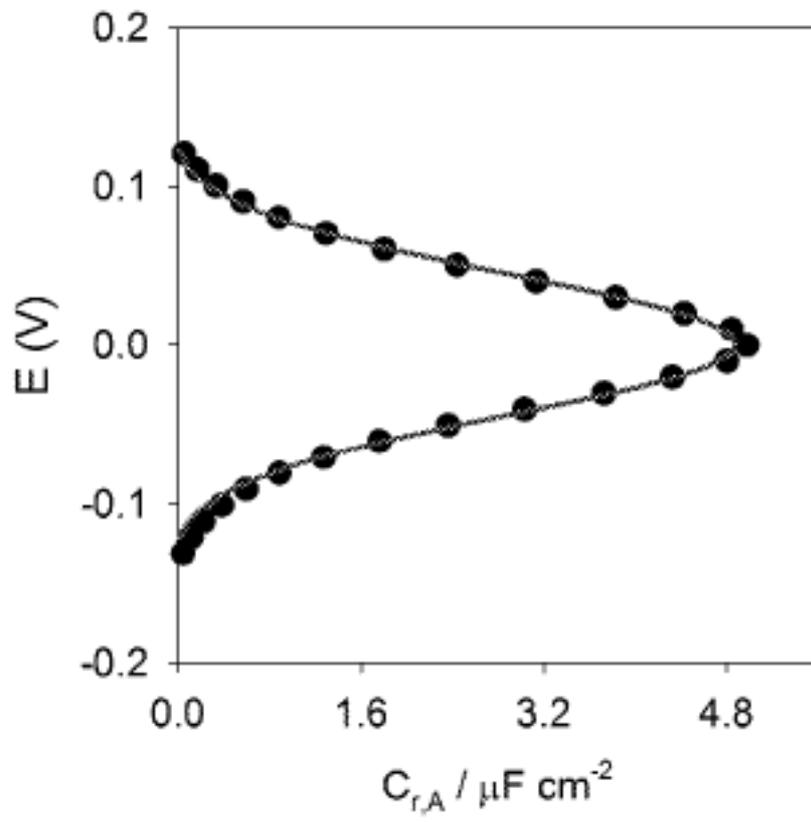


Fig. 12

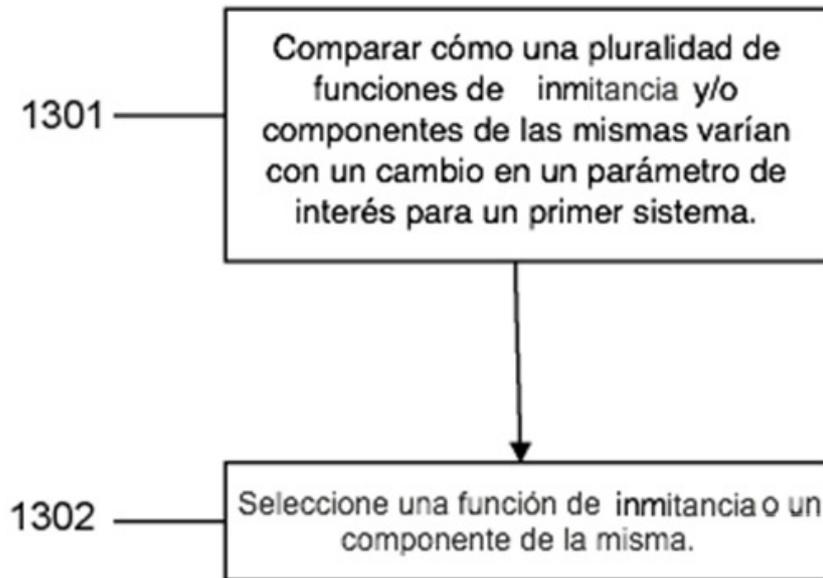


Fig. 13

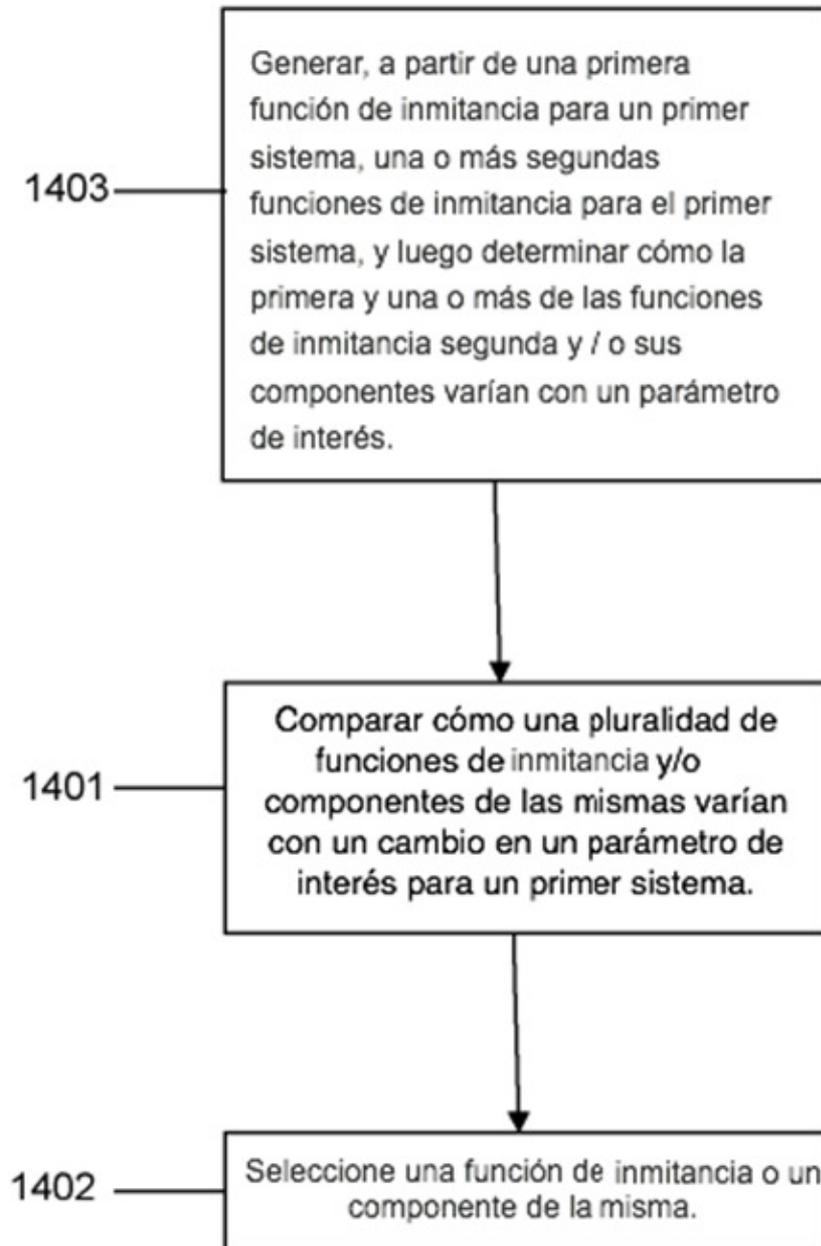


Fig. 14

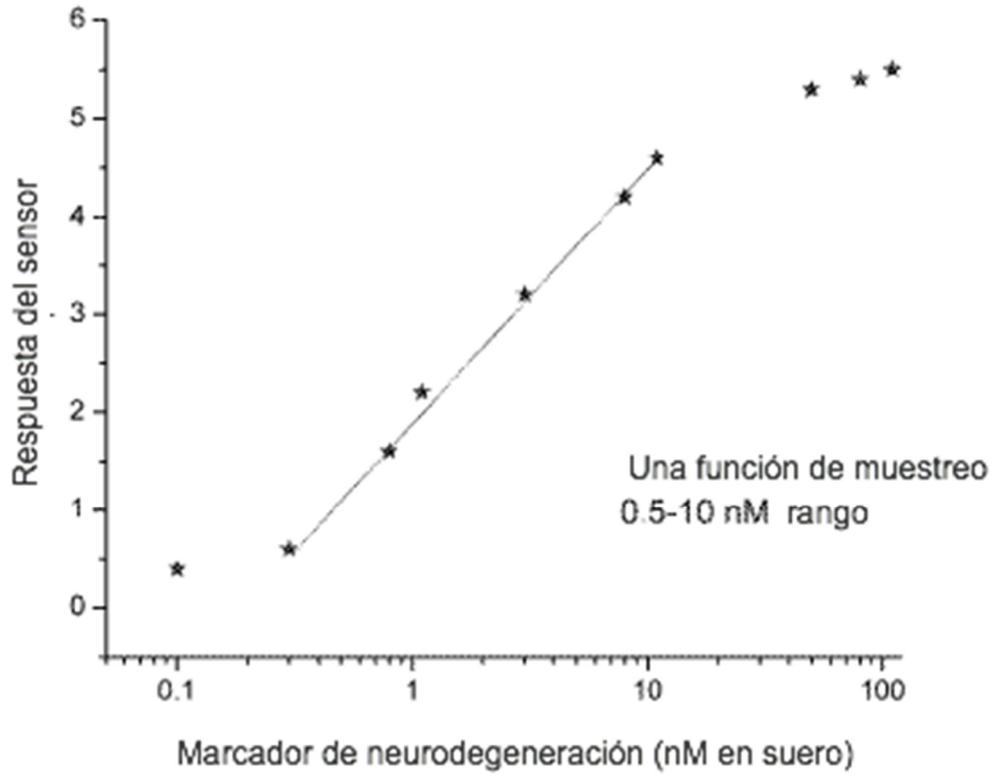


Fig. 15

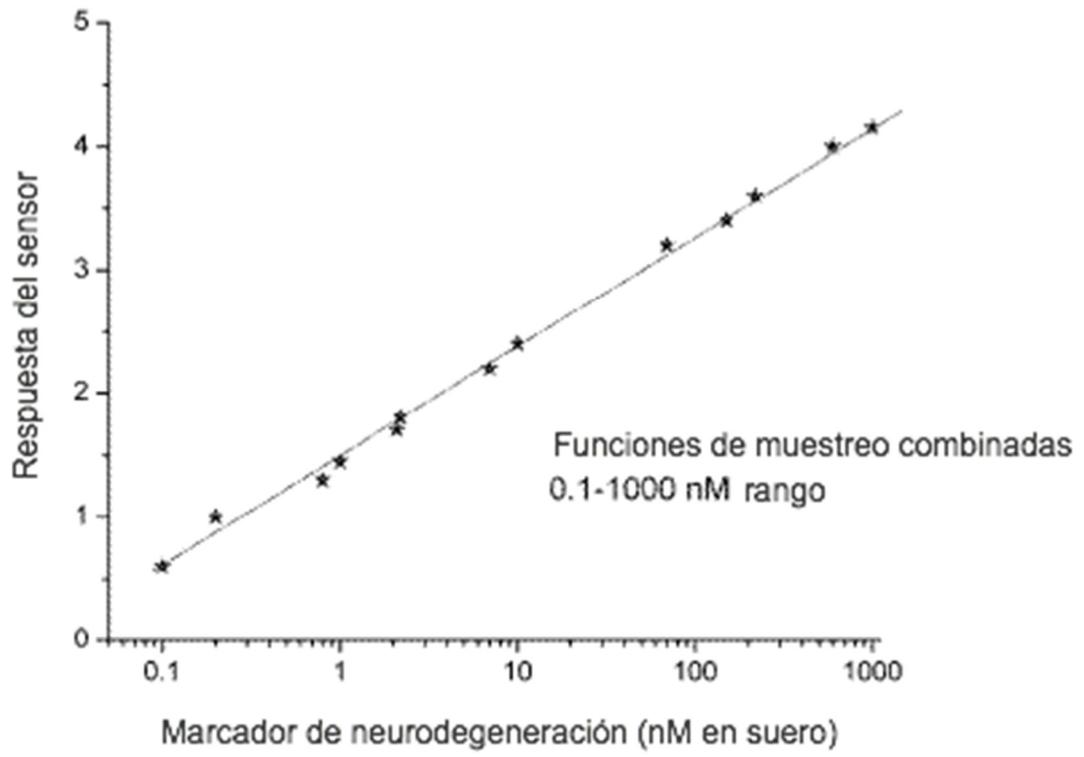


Fig. 16