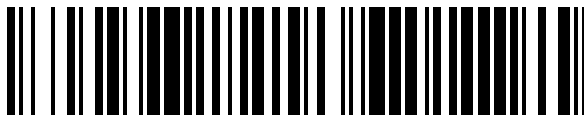


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 322 789**

21 Número de solicitud: 202530828

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 9/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

**21.06.2024**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.09.2025**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.00%)**

**C/ San Francisco, 3**

**33003 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ ABEDUL, M<sup>a</sup> Teresa;**

**COSTA RAMA, Estefanía y**

**RIOBOÓ LEGASPI, Pablo**

54 Título: **DISPOSITIVO DE DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA**

ES 1 322 789 U

## DESCRIPCIÓN

**DISPOSITIVO DE DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA**5 **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un dispositivo para uso en detección electroquímica, particularmente para la detección de secuencias de material genético tras la reacción de amplificación de estas secuencias. La invención proporciona una plataforma todo en uno donde la reacción y la detección ocurren de forma secuencial.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La amplificación de material genético, en concreto la amplificación isoterma LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*, amplificación isotérmica mediada por bucle) se ha convertido en una técnica fundamental de biología molecular en los últimos años y se utiliza ampliamente en el campo del diagnóstico, por ejemplo, para enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso de equipos de bajo coste, que realicen medidas cuantitativas rápidas y fiables, es todavía difícil de implementar.

Por otra parte, la amplificación isotérmica con detección electroquímica todavía tiene algunas limitaciones para su aplicación directa al diagnóstico in situ. El primer problema es la necesidad de utilizar un dispositivo integrado, de modo que la reacción de amplificación y la detección electroquímica se puedan realizar fácilmente en un solo dispositivo. El segundo es la alta probabilidad de contaminación por arrastre. Las reacciones LAMP producen una cantidad muy alta de amplicones (copias generadas de material genético) y, por lo tanto, la manipulación de los productos de la reacción puede contaminar fácilmente los materiales y reactivos empleados en amplificaciones posteriores, haciendo que todas las reacciones den un resultado positivo independientemente de su número de copias inicial (falsos positivos).

Hasta hoy, la mayoría de los sistemas de detección electroquímica para reacciones LAMP se basan en la realización de la reacción de amplificación en un tubo de microcentrífuga para, posteriormente, transferir el contenido a una tarjeta de electrodos serigrafiados (SPE, *screen-printed electrodes*) para realizar la determinación (A. González-López, M.D. Cima-Cabal, P. Rioboó-Legaspi, E. Costa-Rama, M.M. García-Suárez, M.T. Fernández-Abedul, Anal. Chem., 94, 2022, 13061-13067; A. Rodríguez-Penedo, P. Rioboó-Legaspi, A. González-López, A. Lores-

Padín, R. Pereiro, M. M García-Suárez, M.D. Cima-Cabal, E. Costa-Rama, B. Fernández, M.T. Fernández-Abedul, *Adv. Healthc. Mater.*, 2023, 2202972). Sin embargo, a veces se ha depositado el producto de amplificación sobre la superficie de un electrodo de trabajo de una celda electroquímica convencional, como puede ser un electrodo de trabajo de carbono vítreo,

5 que ha sido convenientemente modificado para el reconocimiento de dicho producto de amplificación (N. Y. Jayanath, L. T. Nguyen, T. T. Vu y L. D. Tran, *RSC Adv*, 2018, 8, 34954–34959). Otro enfoque, que combina ambas etapas (reacción y detección) se basa en la realización de la reacción de amplificación en pocillos de microplacas de titulación en cuya base se han incluido electrodos serigrafiados para la detección (A. Martin, K. B. Grant, F. Stressmann,

10 J. M. Ghigo, D. Marchal y B. Limoges, *ACS Sens*, 2016, 1, 904–912). En la literatura se han propuesto algunos dispositivos integrados basados en plataformas microfluídicas con una cámara de reacción donde puede tener lugar la reacción LAMP acoplada a una celda con electrodos serigrafiados (A. Rivas-Macho, U. Eletxigerra, R. Diez-Ahedo, Á. Barros, S. Merino, F. Goñi-de-Cerio, G. Olabarria, *Biosensors*, 2023, 13, 924) o fotolitografiados (A. Rivas-Macho,

15 U. Eletxigerra, R. Diez-Ahedo, S. Merino, A. Sanjuan, M. Bou-Ali, L. Ruiz-Rubio, J. del Campo, J. L. Vilas-Vilela, F. Goñi-de-Cerio, G. Olabarria, *Heliyon*, 2023, 9, e12637). Sin embargo, estos ejemplos son más complejos o de fabricación más costosa, requiriendo equipos adicionales como bombas para la propulsión de fluidos.

20 La investigación sobre dispositivos electroquímicos integrados en tapones todavía está en desarrollo, con sólo unos pocos ejemplos disponibles. Sin embargo, resulta muy ventajosa porque gran parte de las medidas, o de las reacciones adicionales, se realizan en contenedores cerrados. Los enfoques iniciales de los dispositivos con tapones electroquímicos se basaron en la integración de SPEs en tapas de recipientes de mayor volumen, como viales de vidrio con

25 tapón de rosca, para la determinación directa de metales pesados en agua (D. Martín-Yerga, I. Álvarez-Martos, M. C. Blanco-López, C. S. Henry and M. T. Fernández-Abedul, *Anal Chim Acta*, 2017, 981, 24–33). También se han integrado celdas electroquímicas muy sencillas, basadas en elementos de bajo coste y producidos en masa (como alfileres de acero inoxidable), en tubos de microcentrífuga para la determinación de biomarcadores de ictus (A. González-López, E. Costa-

30 Rama, C. G.-C. Fernández, L. Benavente-Fernández, S. Calleja-Puerta, B. Fernández-García, R. Pereiro and M. T. Fernández-Abedul, *Proceedings* 2020, Vol. 60, Page 10, 2020, 60, 10).

Sin embargo, estas estrategias son complejas en cuanto a fabricación o manipulación, o están diseñadas para un objetivo muy específico, lo que dificulta su uso generalizado. Por lo tanto,

35 todavía existe la necesidad de un dispositivo sencillo y económico que resuelva los problemas mencionados de las metodologías anteriores.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la incorporación de una tarjeta con electrodos, plana y flexible sobre un tubo con un extremo abierto destinado a albergar el material a analizar, preferiblemente un tubo de microcentrifuga, creando un dispositivo adecuado para la detección electroquímica. El dispositivo de la invención comprende el mencionado tubo, la tarjeta con electrodos, por ejemplo, SPEs, un adaptador dotado de una abertura y un elemento adhesivo dotado de un orificio que se coloca entre la tarjeta y el adaptador y une los mismos. De este modo, el conjunto de la tarjeta con electrodos, el elemento adhesivo y el adaptador funcionan como un tapón para el tubo permitiendo el cierre de este. A su vez, este tapón sirve como soporte para el análisis del contenido del tubo, una vez invertida la posición del tubo. Así, el contenido del tubo entra en contacto con los electrodos de la tarjeta y se puede analizar el material contenido en el tubo mediante el uso de un equipo de medida, tal como un potenciómetro, bien de meseta o portátil, al que se puedan conectar los electrodos.

El conjunto de la tarjeta con electrodos, el adhesivo y el adaptador permite que cualquier reacción que se lleve a cabo en un tubo con un extremo abierto, susceptible de detección electroquímica, sea detectada de manera sencilla y asequible. Dado que la reacción y la detección tienen lugar en el mismo recipiente, se evita la transferencia de muestras a otro recipiente y, con ello, la contaminación causada por esta transferencia.

El dispositivo de la invención tiene dos elementos principales, uno es el tubo donde se lleva a cabo la reacción, particularmente un tubo de microcentrifuga, y el otro es la tapa que actúa como elemento de detección. De acuerdo con esta configuración, la reacción, que debe ocurrir antes del análisis, se produciría lejos de la tarjeta que funciona como una celda electroquímica, en el tubo, en un ambiente hermético, con poca o ninguna pérdida de volumen. Una vez completada la reacción, la disolución resultante se pondría en contacto con los electrodos de la tarjeta por un simple giro del dispositivo, sin requerir ninguna manipulación adicional. Esta configuración del dispositivo permitiría la integración de reacción y detección, sin pasos de transferencia de líquido que necesitarían material adicional (por ejemplo, micropipetas, puntas...), por lo que se ahorrarían tiempo y costes y aumentaría la precisión de la metodología al evitar la operación humana. Tampoco es necesario el uso de bombas para la introducción de la muestra en cámaras microfluídicas para la reacción y posterior detección.

Además, al utilizar el mismo recipiente, no es necesario abrir el tubo para la detección, y los amplicones (trozos de ADN, ácido desoxirribonucleico, o ARN, ácido ribonucleico, que son fuente

y/o producto de eventos de amplificación o replicación) permanecen confinados dentro del tubo evitando la contaminación biológica. Dado que el dispositivo de la invención se utiliza en metodologías que implican reacciones con material biológico que son muy sensibles, como la LAMP, la configuración del dispositivo de la invención puede suponer una gran ventaja.

5

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10

Figura 1.- Muestra una vista esquemática de una secuencia de un procedimiento para una determinación electroquímica utilizando el dispositivo de la invención.

15

Figura 2.- Muestra una vista de algunas de las piezas que componen el dispositivo.

20

Figura 3.- Muestra un gráfico que presenta los análisis de muestras para RT (*Reverse transcription*, transcripción inversa, que es una etapa previa necesaria para convertir el ARN del SARS-CoV-2 en ADN para la posterior amplificación)-LAMP- ED (*Electrochemical detection*, detección electroquímica). Las muestras se clasifican bajo un número de muestra (1 a 4) y sus resultados de RT-qPCR de SARS-CoV-2 se indican en cuadros grises discontinuos. La primera línea horizontal discontinua indica el nivel de corte, distinguiendo entre muestras negativas y positivas. La segunda línea discontinua indica el límite superior del rango ensayado con la metodología aquí propuesta. Las diluciones de las muestras 3 y 4, indicadas en la gráfica como 1:5, 1:50 y 1:100, se muestran debajo del resultado obtenido sin diluir. Las barras de error en todos los casos representan la desviación estándar de la media obtenida para 3 réplicas según el ejemplo 1.

25

Figura 4A.- Muestra una vista en sección lateral del conjunto de la tarjeta, el adaptador y el elemento adhesivo en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL como contenedor.

30

Figura 4B.- Muestra las vistas superiores del elemento adhesivo, el adaptador y la vista inferior del adaptador respectivamente.

35

Figura 5A.- Muestra una vista en sección lateral del conjunto de la tarjeta, el adaptador y el elemento adhesivo en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL de fondo plano como contenedor.

5      Figura 5B.- Muestra las vistas superiores del elemento adhesivo, el adaptador y la vista inferior del adaptador respectivamente.

10      Figura 6A.- Muestra una vista en sección lateral del conjunto de la tarjeta, el adaptador y el elemento adhesivo en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL con tapón de rosca como contenedor.

Figura 6B.- Muestra las vistas superiores del elemento adhesivo, el adaptador y la vista inferior del adaptador respectivamente.

15      Figura 7A.- Muestra una vista en sección lateral del conjunto de la tarjeta, el adaptador y el elemento adhesivo en la condición de uso de electrodo de trabajo dual en la tarjeta.

20      Figura 7B.- Muestra las vistas superiores del elemento adhesivo, el adaptador y la vista inferior del adaptador respectivamente.

Figura 8A.- Muestra una vista en sección lateral del conjunto de la tarjeta, el adaptador y el elemento adhesivo en la condición de utilizar 8 contenedores.

25      Figura 8B.- Muestra las vistas superiores del elemento adhesivo, el adaptador y la vista inferior del adaptador respectivamente.

## **REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**

30      En una realización de la presente invención, tal y como se aprecia en la figura 1, el dispositivo para detección electroquímica integrada comprende al menos un contenedor (1) con un extremo abierto destinado a contener un material a analizar y al menos una tarjeta (4) con electrodos para detección electroquímica dotada de al menos dos electrodos, destinada a sellar cada contenedor (1) y realizar medidas electroquímicas, un adaptador (2) dotado de al menos una abertura (5) de forma y dimensión adecuada para insertar y ajustar  
35      herméticamente el extremo abierto de cada contenedor (1), al menos un elemento adhesivo (3) dotado de un orificio (6) similar en forma y de igual o mayor dimensión a la de la abertura

(5) que se coloca entre la tarjeta (4) y el adaptador (2) uniendo ambos, de tal modo que el material del contenedor (1) pueda llegar a los electrodos de la tarjeta (4) a través de las aberturas (5) , y el orificio (6) en una posición invertida del contenedor(1).

- 5 El tamaño del contenedor (1) y la abertura (5) del adaptador (2) varía según la reacción y el volumen de la reacción. En la posición invertida del contenedor (1), la solución del contenedor (1) debe cubrir toda la superficie de la tarjeta (4) correspondiente a la abertura (5) del adaptador (2) para así asegurar el contacto con los electrodos de la tarjeta (4). La tarjeta (4), que puede ser de diferentes materiales (poliméricos, cerámicos, etc.), es preferiblemente
- 10 plana y flexible y sirve para la detección electroquímica. La tarjeta (4) tiene unos electrodos que pueden ser serigrafiados o pueden haberse integrado por otra tecnología (p. ej. fotolitografía). La tarjeta (4) tiene al menos dos electrodos, uno de trabajo y el otro de referencia. En caso de tres electrodos, pueden ser un electrodo de trabajo, una referencia y un auxiliar, en el caso de cuatro electrodos puede haber dos electrodos de trabajo, una
- 15 referencia y un auxiliar, etc. El número de electrodos puede variar según la técnica y la metodología empleada para la detección, por ejemplo, se pueden utilizar dos/tres electrodos para medir impedancias y también dos/tres o más electrodos para medir intensidad de corriente.
- 20 El adaptador (2) puede presentar varias aberturas (5) y una configuración alargada en el que las aberturas (5) se encuentran agrupadas para insertar un contenedor (1) para cada abertura (5). Las aberturas (5) pueden organizarse longitudinalmente, circularmente o en una geometría diferente. El adaptador (2), que crea un sellado hermético para el contenedor (1), se puede fabricar mediante impresión 3D u otro método, de un material plástico, por ejemplo,
- 25 poliuretano termoplástico u otro material.

El elemento adhesivo (3) también puede ser una lámina de un material adecuado para unir el adaptador (2) con la tarjeta (4). Por ejemplo, el elemento adhesivo (3) puede ser una lámina adhesiva sensible a la presión de doble cara.

- 30 El elemento adhesivo (3), el adaptador (2), la tarjeta (4) y el contenedor (1) del dispositivo pueden tener diferentes dimensiones. En la figura 4B se muestran las vistas superiores del elemento adhesivo (3), el adaptador (2) y la vista inferior del adaptador (2) respectivamente. Dichos elementos definidos por un ancho, un alto y un diámetro. El elemento adhesivo (3) tiene
- 35 una altura de 16 mm y una anchura de 10 mm y un diámetro de 7 mm para el orificio (6) en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL como contenedor (1). El adaptador (2) tiene una anchura

de 20 mm y un diámetro exterior de 13,5 mm y un diámetro interior de 6 mm para la abertura (5) en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL como contenedor (1).

En la figura 8A se muestran las vistas superiores del elemento adhesivo (3), el adaptador (2) y la vista inferior del adaptador (2), respectivamente. El elemento adhesivo (3) tiene una altura de 16 mm y una anchura de 112 mm y un diámetro de 7 mm para el orificio (6) en la condición de utilizar 8 contenedores (1). El adaptador (2) tiene una anchura de 112 mm y un diámetro exterior de 7 mm y un diámetro interior de 6 mm para cada abertura (5) en la condición de utilizar un tubo de 1,5 mL como contenedor (1).

Según otra realización del dispositivo, este comprende unos medios configurados para:

- añadir una muestra a analizar al contenedor (1) conteniendo al menos una especie de interés,
- tapar el contenedor (1) herméticamente con el conjunto de la tarjeta (4), el adhesivo (3) y el adaptador (2),
- invertir el conjunto del contenedor (1), adaptador (2), adhesivo (3) y tarjeta (4), para poner en contacto el contenido del contenedor (1) con la tarjeta (4),
- realizar una medida para la detección y/o cuantificación de la especie de interés, conectando la tarjeta (4) a un equipo de medida que controla y/o mide propiedades eléctricas en la superficie de uno de los electrodos de la tarjeta (4).

En una realización aún más preferida, el dispositivo está adaptado para permitir la adición de forma previa o posterior a la adición de la muestra, de los reactivos necesarios para que suceda una reacción, previa a la detección, en caso de que sea necesaria esta reacción según el método de análisis preferido por el usuario.

En otra realización aún más preferida, el dispositivo está adaptado para añadir unos reactivos indicadores antes o después de añadir la muestra, en caso de que sea necesaria la presencia de estos para la detección.

Se pueden medir varias propiedades eléctricas con el dispositivo de la invención, por ejemplo, intensidad de corriente eléctrica, impedancia, etc. siendo necesario, en algunos casos, añadir alguna especie adicional al contenedor (1). El equipo de medida puede ser un potenciómetro o cualquier otro dispositivo que realice electroanalíticas conocidas del estado de la técnica.



**Ejemplo 1. Realización de reacciones LAMP para la detección del SARS-CoV-2**

Se describe a continuación un ejemplo de la caracterización del dispositivo objeto de esta invención y la aplicación del mismo para su uso en reacciones LAMP con detección electroquímica de una secuencia específica de material genético del SARS-CoV-2.

**Reactivos**

Para la caracterización del dispositivo se emplearon los siguientes reactivos: ferrocianuro de potasio, tabletas de solución salina tamponada con fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*), azul de metileno, base Trizma y EDTA. Para la reacción de amplificación LAMP se empleó el kit: WarmStart® Colorimetric LAMP 2× *Master Mix* (DNA & RNA) (New England Biolabs), un mix de 6 oligonucleótidos para la secuencia específica y agua apta para PCR (Invitrogen UltraPure™ Distilled Water (DNase/RNase free), Life Technologies), Todos los productos químicos empleados fueron de calidad de reactivo analítico. El agua se purificó usando un sistema Direct-Q® 3 UV Milli-Q (Merck).

**Diseño y fabricación del dispositivo**

Asimismo, se empleó un adaptador (2) de poliuretano termoplástico impreso en 3D adherido a la tarjeta (4) de SPE comercial mediante una lámina de adhesivo (3) sensible a la presión (PSA, Adhesives Research®). Los SPEs utilizados fueron electrodos impresos de película gruesa (S1PE, MicruX Technologies) con un solo electrodo de trabajo de carbono. También se puede utilizar un diseño para las tarjetas (4) que contienen dos electrodos de trabajo de carbono (D2PE, MicruX Technologies). Los contenedores (1) utilizados para el dispositivo fueron tubos de microcentrífuga de grado PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*) sin nucleasas y de baja retención de 0,2 mL (PCR-02-L-C, Axygen™). Para otro tipo de aplicaciones, también se pueden emplear tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (PCRD-015-500, astiKs) o tubos de microcentrífuga de fondo plano de 1,5 mL, tubos poliméricos de fondo plano de 1,5 mL (astiKs) y viales de vidrio con tapa de rosca de 2 mL (SVP2-A02-100, Metria). Asimismo, se puede preparar una tapa 8-multiplex para la realización simultánea de varias reacciones y la posterior detección de los productos de amplificación.

## Detección electroquímica

Se realizaron unas mediciones electroquímicas de las ampliaciones conectando la tarjeta (4) a un potencióstato  $\mu$ AUTOLAB TYPE III (Metrohm), el cual fue controlado por el software NOVA 2.1.5 (Metrohm), a través de un conector de caja (ED-SPE-BOX, MicruX Technologies). En caso de que se emplee un diseño multiplexado, se puede utilizar un conector electrónico común de 60 pines. Las tarjetas (4) con tres electrodos (SPE, 27,5 x 10,1 x 0,35 mm, sustrato blanco PET de 350  $\mu$ m de espesor) constan de un electrodo de trabajo (WE) con forma de círculo de 3 mm de diámetro (con un área de 7,1 mm<sup>2</sup>) y un contraelectrodo (CE) en forma de gancho, ambos fabricados con tinta de carbono, además de un electrodo de referencia (RE) fabricado con tinta de plata. Además, se puede utilizar un diseño de cuatro electrodos. En este caso, la tarjeta (4) tiene dos ranuras paralelas serigrafiadas con tinta de carbono (1,0 x 2,5 mm, es decir, 2,3 mm<sup>2</sup> de área) que actúan como electrodos de trabajo, un contraelectrodo de carbono en forma de gancho, que rodea estos 2 WEs y el electrodo de referencia, serigrafiado con tinta de plata, formando una ranura perpendicular a ambos WEs. Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó el tubo de microcentrífuga y se cerró con la combinación de la tarjeta (2), el adaptador (2) y el adhesivo (3). A continuación, se invirtió el dispositivo depositando todo el volumen de la reacción sobre los electrodos de la tarjeta (4). Las medidas se registran a temperatura ambiente y se utiliza un dispositivo para cada medición.

## Toma de muestra

Se tomaron muestras nasofaríngeas (NP) utilizando hisopos de Nylon flocados (SW01E, Biocomma Ltd.) en un hospital. Los hisopos NP se depositaron en tubos que contenían 500  $\mu$ L de disolución reguladora Tris-EDTA 10 mM (TE, pH 8,0). Las muestras fueron inactivadas por calor (95 °C durante 5 min) antes de su transporte fuera de las instalaciones hospitalarias.

## Diseño y caracterización electroquímica del dispositivo

Para evaluar el dispositivo, se depositaron en el tubo 50  $\mu$ L de una disolución de ferrocianuro de potasio 5 mM en PBS y se tapó el tubo con la tarjeta (4) que está unida al adaptador (2) a través de una lámina de adhesivo (3). Si se produce una reacción, el tubo se mantiene en esta posición. En este caso, en el que se pretende la caracterización, no hay ninguna reacción, por lo que el dispositivo se invierte, como se muestra en los esquemas de la figura 1 para el registro de la medida electroquímica, observándose la oxidación del ferrocianuro y la correspondiente reducción del ferricianuro generado. Se observaron los procesos redox

empleando volúmenes de 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$ . Al realizar estas medidas se observó que el tubo (1) contactaba convenientemente con los electrodos de trabajo, referencia y contraelectrodo ubicados en la tarjeta (4).

- 5 Para la realización de reacciones de tipo LAMP, el tubo que contiene la mezcla *master mix* (una mezcla que contiene precursores y enzimas utilizadas como ingrediente en reacciones de amplificación) y al que se añade el estándar o la muestra con material genético, se cierra con una tapa electroquímica, que es el conjunto de la tarjeta (4), el adaptador (2) y el adhesivo (3), creando un sellado hermético. A continuación, el tubo se invierte y luego se usa la tarjeta
- 10 (4) para la detección, ya que el contenido del tubo fluye hacia la tarjeta (4) sin fugas.

- Los equipos y condiciones necesarios para cada operación (reacción o detección) son compatibles entre sí. Para este ejemplo de reacciones de amplificación LAMP, la mezcla de reacción se mantiene a 65 °C durante 30 min. Dado que se realiza un procedimiento
- 15 isotérmico, no requiere termociclador, y el calor puede ser proporcionado por un calentador o una estufa de laboratorio. Por otro lado, el dispositivo presenta un sellado hermético ya que después de mantenerlo en el horno en condiciones de reacción no se apreció evaporación. En cuanto al equipo necesario para las medidas electroquímicas, se puede conectar fácilmente un potencióstato, ya sea directamente o a través de una interfaz, dependiendo del
- 20 tipo de potencióstato que se emplee, bien portátil o de meseta, respectivamente.

### Detección del SARS-CoV-2

- Según los resultados anteriores, se evaluó el uso del dispositivo para la detección de
- 25 reacciones LAMP. Esta determinación se basa en el comportamiento dependiente del pH del rojo de fenol (*phenol red*, PR), un indicador visual común en reacciones LAMP. El rojo de fenol ya está incluido en la *master mix* y cambia de rojo a amarillo ( $\text{pK}_a=7,9$ , disoluciones tampón *Britton-Robinson* 0,1 M). Este indicador electroactivo presenta un proceso anódico irreversible con un potencial de pico que cambia con el pH. A medida que avanza la amplificación, se
- 30 liberan protones y se produce una disminución del pH. Por tanto, la diferencia entre los potenciales final e inicial ( $\Delta E_p$ ) es una señal analítica adecuada que puede correlacionarse con el número inicial de copias de ácido nucleico.

- Para evaluar la señal obtenida con el dispositivo, se representó el potencial de pico ( $E_p$ ) del
- 35 proceso de oxidación del PR, obtenido para diferentes valores de pH. Se puede observar la variación en este parámetro, de forma que los valores de pH más bajos muestran un  $E_p$  más

alto. El dispositivo responde como se esperaba en el rango de pH de las reacciones LAMP que utilizan este indicador colorimétrico, y a la vez electroactivo (rojo de fenol). Después de incluir la *master mix* y la muestra, la reacción y detección se llevaron a cabo sin necesidad de transferir el contenido desde el tubo a una celda electroquímica que es una tarjeta con electrodos independiente para su detección.

Después de evaluar el dispositivo y observar el desplazamiento del proceso de oxidación del rojo de fenol basado en el cambio de pH, se utilizó para la cuantificación del producto de reacciones de amplificación LAMP. Para ello, se realizó un conjunto de reacciones LAMP utilizando cebadores del SARS-CoV-2 para un segmento del gen N y estándar de ARN del SARS-CoV-2. En primer lugar, la disolución de muestra (o estándar) se agregó al tubo que contiene la mezcla de reacción. El tubo se cerró usando la tarjeta (4) pegada al adaptador (2) y la reacción se realizó en un calentador a 65 °C. Después de 30 minutos, la reacción se completó y los resultados se observaron visualmente (los negativos con color rosa y los positivos con color amarillo)

Como el tubo está completamente cerrado y no es necesario abrirlo una vez que la reacción termina, tampoco es necesaria la adición de uracil-ADN glicosilasa (UDG). La UDG es una enzima que se utiliza normalmente en aquellos ensayos en los que se manipulan los productos de reacción, ya que puede provocar contaminación por arrastre. Sin embargo, dado que la configuración del dispositivo evita contaminaciones, no es necesario adicionar esta enzima. Para una determinación electroquímica, se invierte el tubo para que el contenido fluya hacia la tarjeta y luego de conectar el potenciómetro, se registra un voltamograma de barrido lineal (LSV), midiendo el potencial del pico anódico del rojo de fenol. A medida que avanza la reacción LAMP, se liberan protones y aniones pirofosfato, disminuyendo el pH de la reacción. Las reacciones con un número de copias inicial más alto conducirían a una mayor caída del pH y, por lo tanto, a un cambio mayor en el potencial de pico anódico, que se evaluó para diferentes concentraciones iniciales de ARN del SARS-CoV-2.

Para validar este método, se recolectaron y analizaron 4 muestras de exudado nasofaríngeo (NP) utilizando esta metodología. Las muestras se analizaron inicialmente sin diluir. En la figura 3 se puede ver que las muestras negativas de RT-qPCR mostraron un  $\Delta E_p$  por debajo del límite de detección, y las muestras positivas de RT-qPCR presentaron un  $\Delta E_p$  más allá del rango lineal.

Para comprobar la linealidad del método y cuantificar las muestras positivas, se realizaron diluciones seriadas de dichas muestras (1:5, 1:50 y 1:100) y luego se analizaron mediante RT-LAMP-ED con el dispositivo (Figura 3, conjunto de datos en la parte indicada como “positivo”). Los productos de amplificación mostraron una concentración de  $2,9 \cdot 10^3$  y  $4,6 \cdot 10^3$  copias  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  para las muestras 3 y 4, correlacionándose con sus valores de PCR (Ct, ciclo umbral o *threshold cycle* de 28 y 18, respectivamente). La representación de los valores de variación en potencial de pico para las diluciones de las muestras 3 y 4 frente a la dilución mostró una relación lineal con un coeficiente de determinación de 0,992 y 0,9991, respectivamente, con pendientes muy cercanas a la de la curva de calibrado realizada con estándares de ARN, lo que indica que los efectos de la matriz son insignificantes.

## Conclusiones

El dispositivo presenta un comportamiento robusto y preciso en una amplia gama de volúmenes, en el rango de los microlitros, con una desviación estándar relativa de la señal analítica por debajo del 4 % para volúmenes que abarcan desde 50 hasta 200  $\mu\text{L}$ . El dispositivo fue validado con muestras clínicas y mostró una coincidencia del 100% con los resultados de RT-qPCR, en base a los resultados del Ct.

## Adaptaciones del dispositivo

El dispositivo de la invención es una plataforma versátil para cualquier propósito (bio)electroanalítico que pueda llevarse a cabo en un tubo de microcentrífuga. El dispositivo se puede utilizar para múltiples aplicaciones introduciendo variaciones, no sólo en términos de volumen, sino también de material, forma, etc., teniendo en cuenta cuestiones como la compatibilidad del material, la posible agitación de la reacción o la monitorización en continuo, así como la posibilidad de realizar análisis multiplexados. Se han diseñado otros modelos para ampliar las posibilidades del dispositivo.

La primera adaptación del diseño ha considerado la posibilidad de utilizar diferentes volúmenes de reacción y, por tanto, de los tubos de microcentrífuga. El tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se encuentra entre los materiales consumibles más utilizados en muchos laboratorios. Además, también podría extrapolarse a otros recipientes de líquidos, como tubos de fondo plano, viales de vidrio con tapa de rosca. Esto proporciona una plataforma para recipientes basados en diferentes materiales (por ejemplo, polímeros o vidrio) y fondos, cónico o plano, permitiendo este último la agitación magnética cuando se incluyen

imanes pequeños. En el caso del vial de vidrio, el adaptador (2) se ha modificado para convertirlo en un tapón de rosca, allanando el camino para la adaptación a cualquier otro envase con tapón de rosca. Igualmente podría diseñarse para recipientes con sección diferente a la circular (p. ej. para prismas cuadrangulares como son algunas cubetas de espectrofotometría VIS-UV).

Respecto a la tarjeta (4), el dispositivo de la invención puede integrar tarjetas que contengan no sólo diferentes materiales de electrodo (oro, platino, carbono modificado, etc.), sino diferente número de electrodos o diseños. Por ejemplo, el empleo de dos electrodos de trabajo para diferentes bioaplicaciones, como puede ser la detección simultánea de diferentes analitos realizando diferentes modificaciones en cada electrodo de trabajo. También puede emplearse para aumentar la precisión de las medidas, obteniendo dos medidas para la misma disolución. Para ello, se incorporó una tarjeta (4) con dos electrodos de trabajo.

En el campo del análisis multiplexado también se ha diseñado una tapa consistente en una plataforma para 8 contenedores (1). Podría acoplarse a un potencióstato de 8 canales o a 8 potencióstatos de tipo USB, proporcionando medidas simultáneas en un solo movimiento, con una única inversión de la plataforma. Las tarjetas (4) de 8 canales se han utilizado ampliamente para aplicaciones bioanalíticas, donde, con una sola plataforma, se pueden analizar varias muestras para la determinación de un único analito. Alternativamente, se pueden medir varias réplicas de una muestra para evaluar la precisión. Además, también se pueden analizar varios analitos en una única muestra o realizar curvas de calibrado en un solo lote. Esto se ha aplicado en varios campos, como el análisis de exosomas, la detección de mutaciones puntuales en el ADN o la determinación de puntos cuánticos, entre otros. Además, este diseño se puede ampliar, generando un dispositivo que contenga cualquier cantidad de contenedores (1) múltiplo de 8. Gracias a la flexibilidad de su material, se puede doblar un extremo de la tarjeta (4) donde están situadas las conexiones de los electrodos al potencióstato, para obtener plataformas completamente funcionales. Con eso, las filas de 8 contenedores (1) se pueden conectar fácilmente al potencióstato a través de conectores de clavijas comunes para opciones de multiplexación.

Además, el dispositivo también permite cualquier modificación de la tarjeta (4) o de los contenedores. La tarjeta puede ser de material polimérico, cerámico u otro y los electrodos pueden tener diferentes dimensiones o haber sido obtenidos con diferentes medios de fabricación (por ejemplo, tecnología *thin film* en vez de la *thick film* de los electrodos serigrafiados). Por ejemplo, pueden incluir nanomateriales o elementos de

(bio)reconocimiento, para crear nuevas plataformas integradas para bioanálisis. El dispositivo se puede usar para las aplicaciones a diversos tipos de (bio)ensayos, como amplificaciones de ADN, inmunoensayos, ensayos enzimáticos, o síntesis donde productos y/o intermediarios sean electroactivos, entre otros.

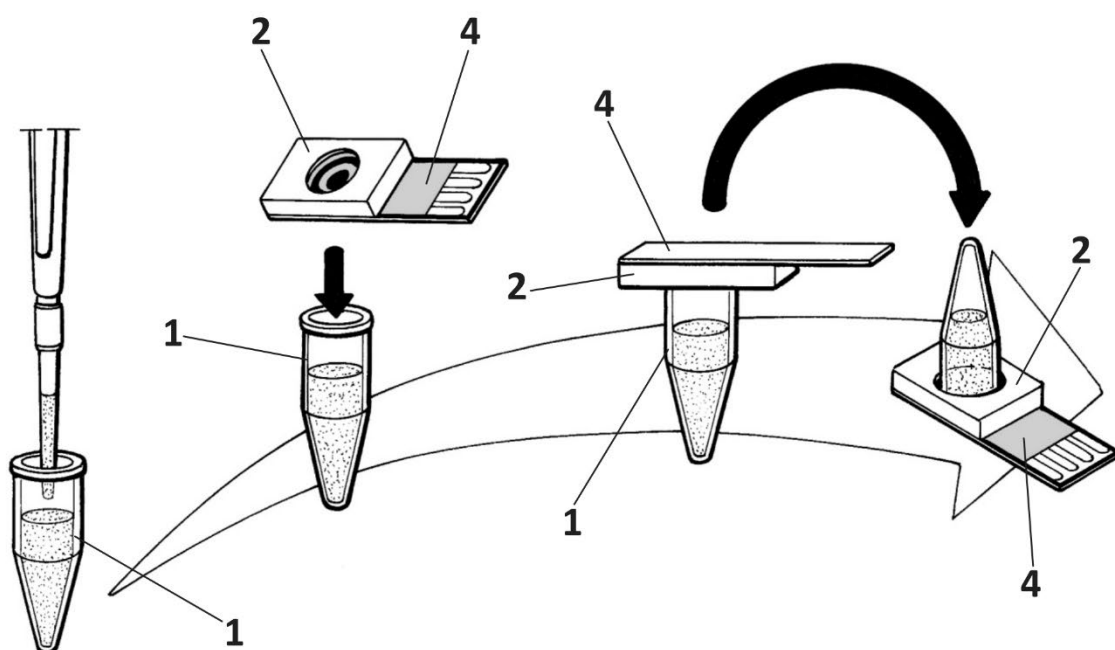
**REIVINDICACIONES**

1.- Dispositivo para detección electroquímica caracterizado por que comprende:

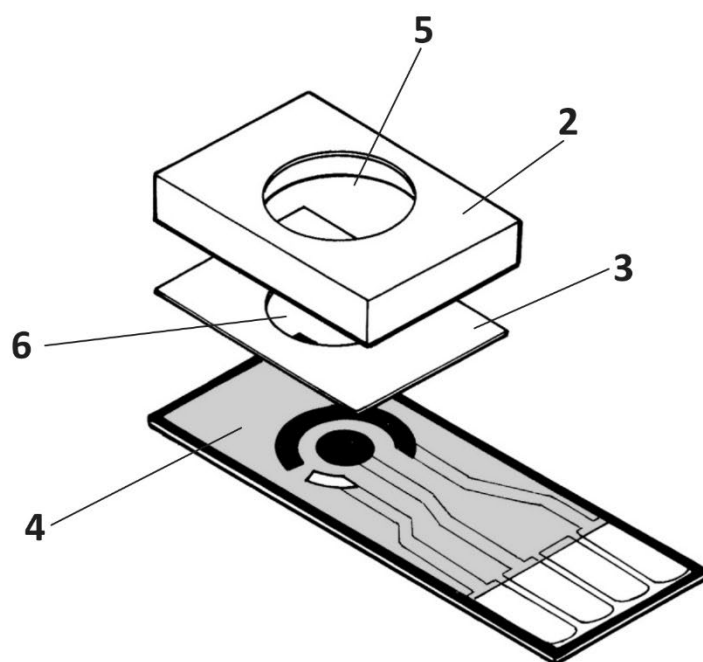
- al menos un contenedor (1) con un extremo abierto destinado a contener un material a analizar,
- 5    - al menos una tarjeta (4) con electrodos para detección electroquímica dotada de al menos dos electrodos, en los que al menos uno de ellos es un electrodo de trabajo, destinada a sellar cada contenedor (1) y realizar medidas electroquímicas,
- un adaptador (2) dotado de al menos una abertura (5) de forma y dimensión adecuada para insertar y ajustar herméticamente el extremo abierto de cada contenedor (1),
- 10    - al menos un elemento adhesivo (3) dotado de un orificio (6) similar en forma y de igual o mayor dimensión a la de la abertura (5) colocado entre la tarjeta (4) y el adaptador (2) uniendo ambos, de tal modo que el material del contenedor (1) pueda llegar a los electrodos de la tarjeta (4) a través de la abertura (5) y el orificio (6) en una posición invertida del contenedor (1).

15    2. El dispositivo de la reivindicación 1, caracterizado por que el adaptador (2) presenta varias aberturas (5) y una configuración alargada en el que las aberturas (5) se encuentran agrupadas para insertar un contenedor (1) por abertura (5).





**FIG. 1**



**FIG. 2**

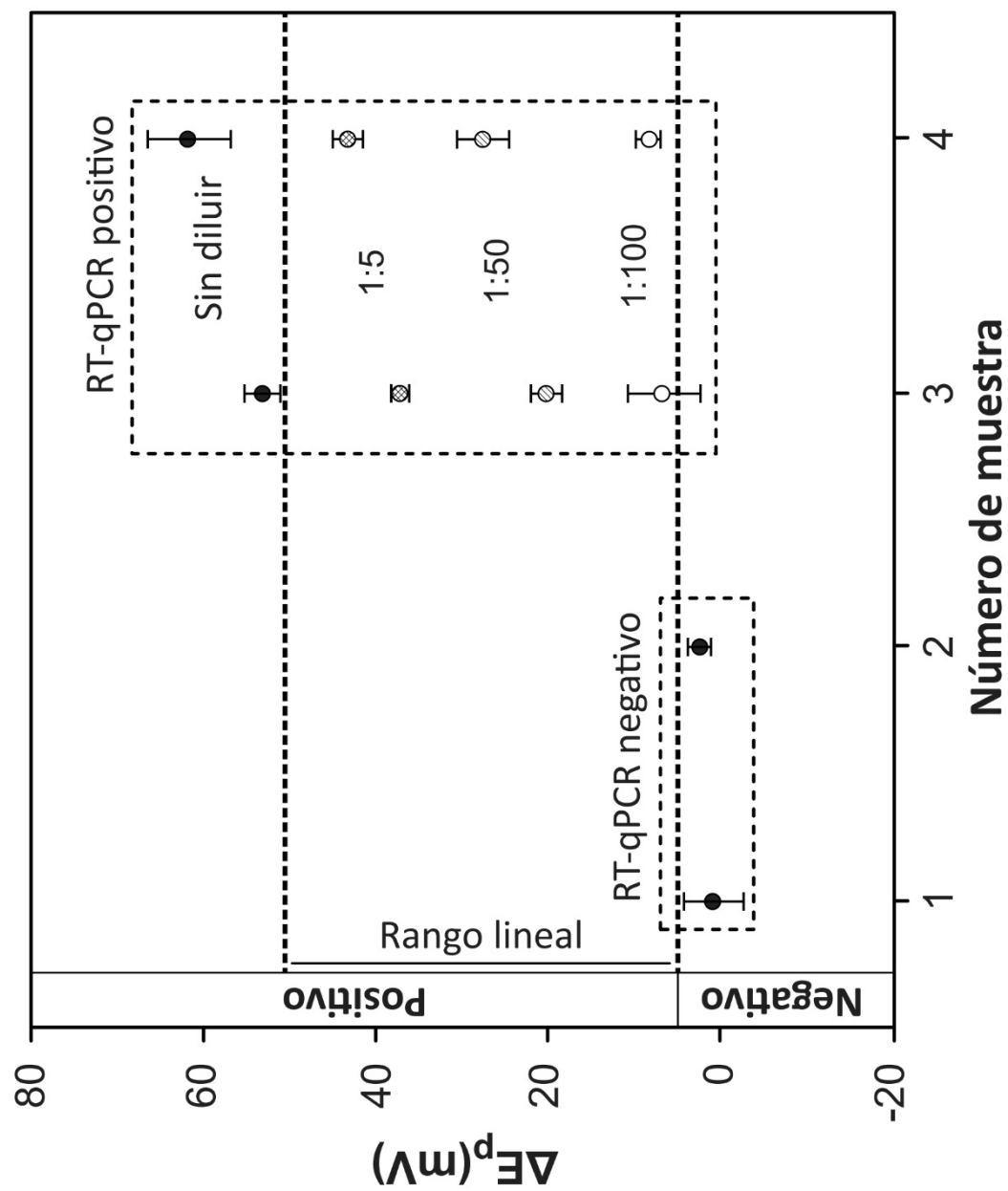
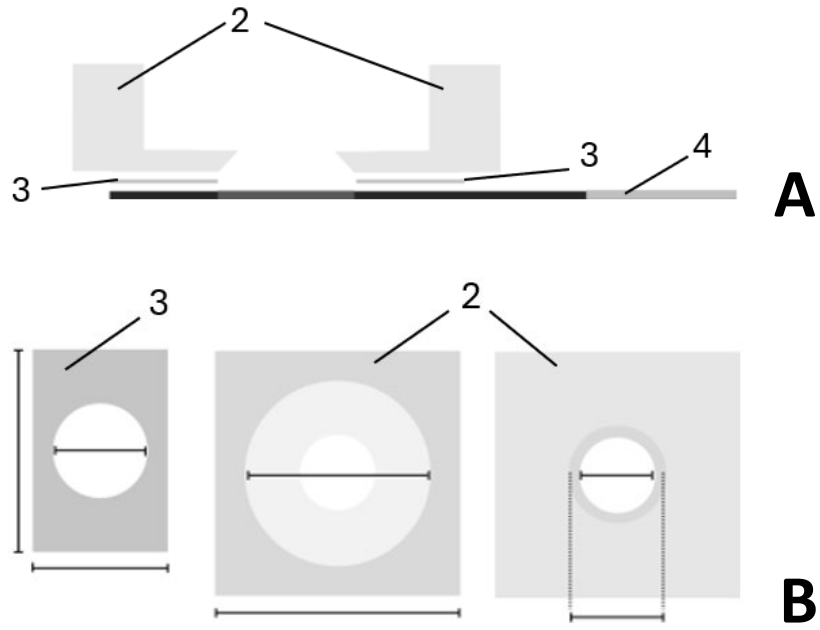
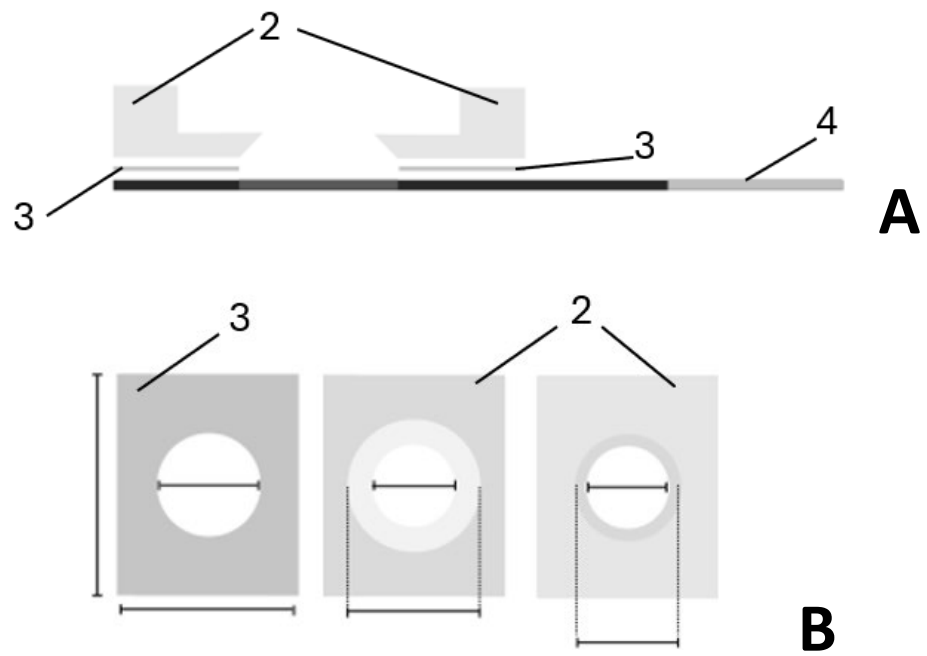


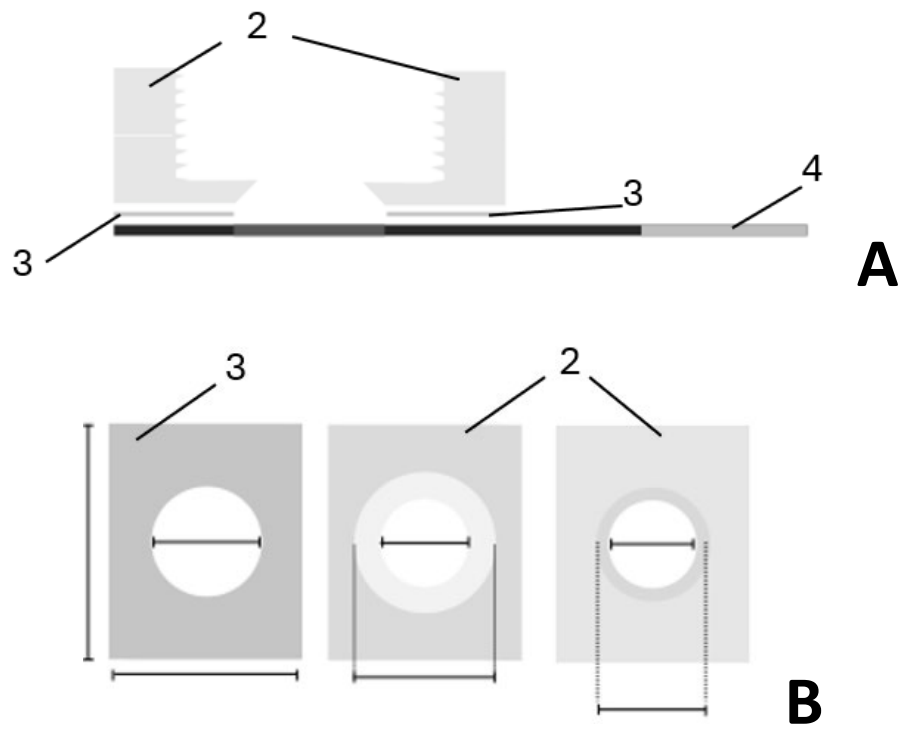
FIG. 3



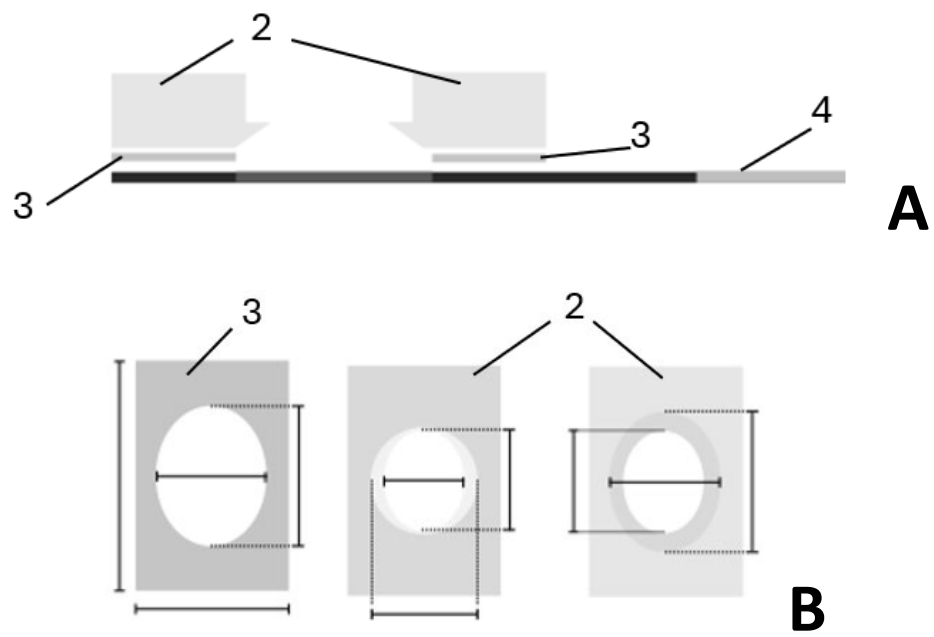
**FIG. 4**



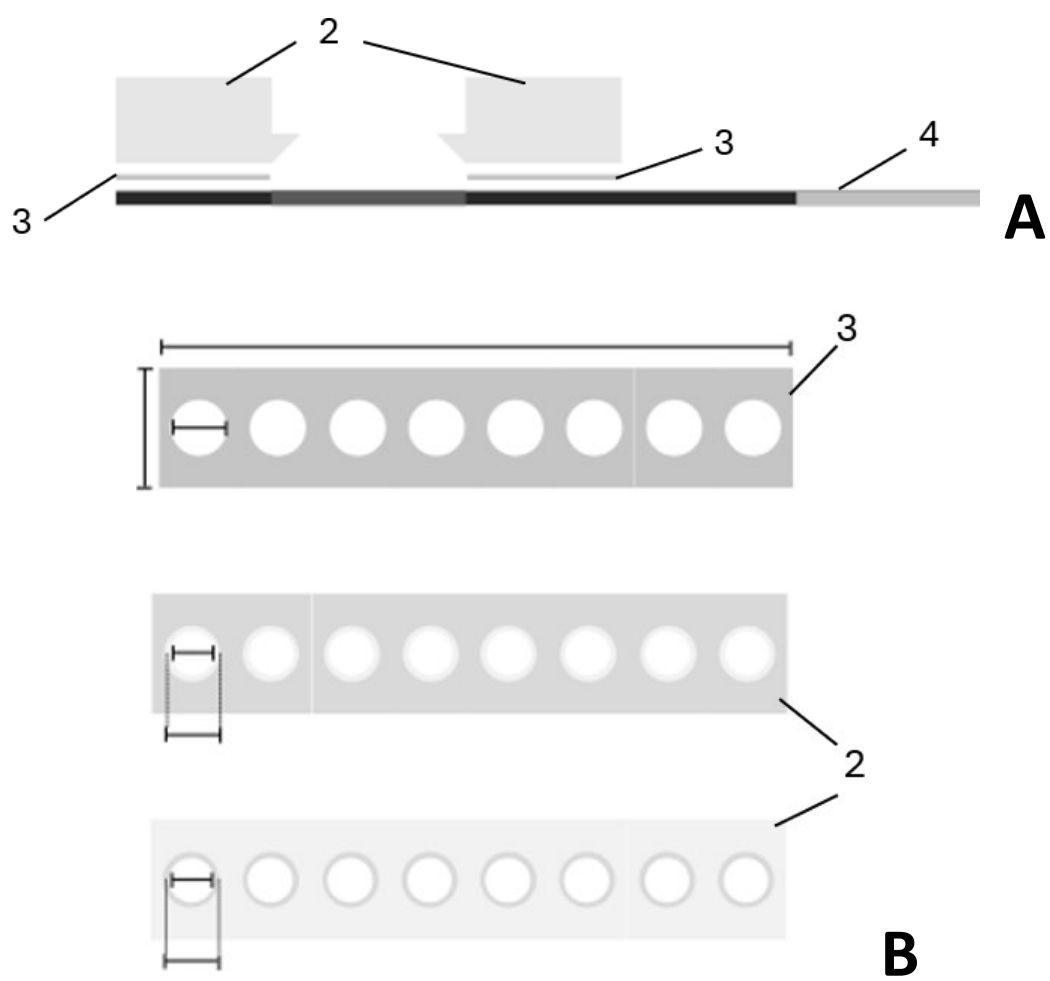
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**