



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 103 197**

⑫ Número de solicitud: 9501590

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 27/26

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **04.08.95**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.97**

Fecha de concesión: **10.12.97**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.01.98**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.01.98

⑦③ Titular/es: **Universidad de Alcalá de Henares
y Universitat Rovira i Virgili -
Servei de Tecnologia Química (S.T.Q.)
O.T.R.I. Edificio de Medicina,
Campus Universitario
28871 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Domínguez Cañas, Elena;
Narváez García, Arántzazu;
Parellada Ferrer, Josefina y
Katakis, Ioanis**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Pasta conductora, electrodos y sensores electroquímicos que comprenden dicha pasta conductora, y su método de preparación.**

⑤⑦ Resumen:

Pasta conductora, electrodos y sensores electroquímicos que comprenden dicha pasta conductora, y su método de preparación.

La pasta conductora comprende un material conductor en forma de partículas que se mantienen unidas en una matriz que puede ser modificada para incluir elementos de reconocimiento y/o transductores electroquímicos. El material conductor comprende partículas de carbono, partículas metálicas o partículas de carbono metalizado. La matriz comprende una sustancia polimérica de unión que puede ser hidrófila o hidrófoba. Los electrodos comprenden dicha pasta conductora y opcionalmente un mediador, mientras que los sensores comprenden además, un agente de reconocimiento químico o biológico. Los electrodos y sensores, alcanzan elevadas densidades de corriente, son altamente permeables y rígidos y se pueden construir mediante técnicas de impresión serigráfica o por chorro. También se proporcionan instrumentos analíticos y equipos electroquímicos que comprenden al menos uno de dichos electrodos o sensores.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Campo de la técnica

Esta invención se refiere a las técnicas de construcción de electrodos de micropartículas. En particular se refiere a electrodos consistentes en partículas de carbono u otros materiales conductores microparticulados que se mantienen unidos en una matriz hidrófila consistente, a su vez, en un polímero hidrófilo y que es capaz de mantener su consistencia en medios hidrófilos. El mismo principio se cumple en ambientes hidrófobos. La matriz del electrodo puede ser modificada en su seno para incluir elementos de reconocimiento biológico y químico y/o transductores electroquímicos. La técnica puede ser usada para fabricar tintas que son imprimibles mediante impresión serigráfica ("screen printing") o impresión por chorro ("jet printing").

Introducción

Los métodos electroquímicos para la detección y análisis de analitos en muestras complejas ofrecen, en general, una alternativa selectiva, sensible y de bajo coste frente a las técnicas analíticas clásicas que exigen laboriosas operaciones previas y costosa instrumentación. Especialmente, tras la aparición de los biosensores, varias configuraciones de electrodos han sido desarrolladas para que el comportamiento analítico de dichos electrodos se ajuste a los requerimientos de fiabilidad y practicabilidad analítica (p.e. exactitud, precisión y bajo coste de producción) de un instrumento analítico. Dichas configuraciones han hecho uso de fibras de carbono, fotolitografía, impresión en pantalla ("screen printing") y materiales de pasta de carbono.

Simultáneamente, resulta especialmente importante conseguir la miniaturización y la manufactura de los electrodos. Un problema común y relacionado con la miniaturización estriba en la necesidad de alcanzar elevadas densidades de corriente de tal forma que los electrodos miniaturizados puedan producir corrientes fácilmente medibles sin la necesidad de sistemas electrónicos sofisticados de amplificación de corriente y reducción de ruido. Para que dichas densidades de corriente se consigan, el flujo de electrones al electrodo no debiera estar limitado por procesos cinéticos y debería ser tan próximo como fuese posible a un proceso limitado por difusión o transporte de materia (siempre y cuando no se introduzca una barrera externa difusional mediante una membrana) del sustrato (analito) a la superficie del electrodo. De esta forma se consiguen flujos de electrones elevados que se traducen en elevadas corrientes de electrooxidación o electroreducción (en el modo amperométrico de operación) o tiempos de respuesta muy cortos (en el modo potenciométrico). La manufactura requiere que los electrodos puedan ser construidos en condiciones tales que las características de respuesta sean lo más uniforme posible. Otros requerimientos para la manufactura de electrodos se refieren a su estabilidad operativa y de conservación a largo plazo así como a su firmeza o resistencia.

Específicamente y de aplicación a los biosensores hay que añadir la exigencia de obtener reproducibilidad en la mezcla de las distintas partes

constitutivas: la de reconocimiento biológico y la de transducción (es decir, moléculas biológicas y un mediador o una sustancia capaz de transferir electrones) y varios electores que puedan mejorar la actividad de la molécula biológica.

En la mayoría de las aplicaciones analíticas de los electrodos enzimáticos amperométricos o inmunosensores, las matrices son acuosas y los analitos generalmente son sustancias hidrófilas. En estos casos y para conseguir un elevado flujo de electrones, los electrodos tienen que poseer una elevada permeabilidad e hidrofilia ofreciendo una gran área superficial a la matriz analítica. Adicionalmente, en muchas de estas configuraciones, en las que la señal de transducción de la reacción biológica es efectuada a través del uso de mediadores de transferencia de electrones, el microambiente del electrodo tiene que favorecer las velocidades de reacción del analito con la molécula biológica y de la molécula biológica con la química de transducción, manteniendo al mismo tiempo la actividad electrocatalítica de la fase conductora alta para que todos los procesos sean lo más rápidos posible. De esta manera, se puede conseguir el objetivo mencionado anteriormente y el paso límite (el más lento) resulta ser el de transporte del analito al electrodo.

Estado actual de las técnicas

En los últimos 20 años se han desarrollado diversas configuraciones de electrodos con los criterios mencionados anteriormente. Este esfuerzo ha sido creciente debido al desarrollo simultáneo de los biosensores. Las aplicaciones de dichas configuraciones son sistemas analíticos de uso prolongado o bien de un único uso. Las configuraciones que han resuelto el problema de las densidades de corriente se orientan hacia el aumento del área superficial específica de los materiales (p.e., uso de grafito reticulado [Wang, J. (1981) *Anal. Chim. Acta*, **26**, 1721-1726] o electrodeposición de partículas conductoras [Crumbliss, A.L., Perine, S.C., Stonehuemer, J., Tubergen, K.R., Zhao, J., Henkens, R.W., and O'Daly, J.P. (1992) *Biotechn. Bioeng.*, **40**, 483-490; Ocon-Esteban, P., Leger, J.-M., Lamy, C., and Genies, E. (1989) *J. Appl. Electrochem.*, **19**, 462-464]). Estas estrategias generalmente plantean problemas de manufactura y añaden pasos adicionales en los procesos de producción.

Una alternativa que se presenta prometedora para diseños que permitan elevados costes de producción (p.e., de uso prolongado o continuo) es el uso de fotolitografía para construir la base conductora del electrodo y la subsiguiente modificación de los electrodos formados con las partes biológicas y de transducción. Además del elevado coste, esta técnicas implican varios pasos de producción aumentando la complejidad y yendo en detrimento de la reproducibilidad del proceso.

Se han descrito configuraciones de electrodos basadas en carbono sólido y en materiales de pasta de carbono [Gilmartín, A.T.M., and Hart, J.P. (1995) *Analyst*, **120**, 1029-1045; Gorton, L. (1995) *Electroanalysis*, **7**, 23-45; Kalcher, K., Kauffmann, J.M., Wang, J., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C., and Yang, Z. (1995) *Electroanalysis*, **7**, 5-22]. En estos trabajos aparecen cientos de configuraciones con algunas ca-

racterísticas comunes: i) el uso de una matriz hidrófoba (líquido plastificante) para mantener unido el material conductor microparticulado en el medio hidrófilo de la muestra y ii) el recubrimiento con membranas para retener unidos los elementos biológicos y de transducción en la proximidad de los electrodos; adicionalmente estas membranas disminuyen dramáticamente el flujo de transporte de materia del analito a la superficie del electrodo estableciéndose un “pseudocontrol” por difusión. Inicialmente, puede pensarse que estas configuraciones poseen una elevada área superficial que, sin embargo, es electroinactiva por la presencia del líquido plastificante hidrófobo. A esta limitación hay que añadir que el flujo del analito depende de las características de la membrana de recubrimiento, de tal forma que estos electrodos tienen escasa reproducibilidad y ofrecen densidades de corriente muy bajas (por consiguiente el grado de miniaturización está muy limitado). No obstante, las configuraciones basadas en pasta de carbono ofrecen todavía ventajas tecnológicas significativas ya que permiten la mezcla en la matriz y la modificación de la fase conductora y de reconocimiento (biológico en el caso de biosensores) y de transducción.

Resumen de la invención

Se introduce el concepto de **fases de electrodos** consistentes en materiales microparticulados conductores. Basándose en esta configuración de fases se simplifica la manufactura de electrodos, y especialmente de biosensores, y se obtienen electrodos fácilmente miniaturizables y reproducibles.

En particular, para electrodos que vayan a operar en matrices analíticas acuosas (sangre, caldos de fermentación, afluentes industriales, etc.) el material conductor microparticulado se mantiene unido no con una matriz hidrófoba sino con una hidrófila que puede ser un polímero soluble en agua con o sin la posibilidad de una modificación química. Un ejemplo de dicho polímero puede ser poli(vinilpiridina), tal y como se muestra en la Figura 1b, donde un determinado número de piridinas han sido cuaternizadas con etilaminas. El material polimérico de unión tiene que incorporarse a la fase en un porcentaje en peso superior o igual al 10%.

La fase conductora microparticulada, Figura 1a, puede consistir en partículas de carbono de varios diámetros y puede contener partículas de metales o partículas de carbono metalizadas. La matriz polimérica puede contener funcionalidades que interaccionen con las partículas conductoras (p.e., mitades de piridina que pueden interaccionar hidrofóticamente con la superficie de carbono) y/o grupos que pueden ser entrecruzados fácilmente (p.e., aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, etc.).

El material de unión y el conductor se mezclan en proporciones distintas dependiendo de las características que se quieran conferir a los electrodos. La mezcla puede hacerse, sin necesidad de un control de humedad, si bien y en general la adición de una mínima cantidad de agua mejorará la homogeneidad de la pasta resultante. A escala de laboratorio, la mezcla es eficiente en un mortero pero a escala industrial

se puede utilizar un tambor de mezclado u otro equipo similar. La fase conductora es carbono o grafito, con o sin modificación (p.e., tratamiento con plasma, oxidación química o electroquímica) o micropartículas de metales añadidas a la matriz o depositadas electroquímicamente. La fase de unión puede contener, además de los distintos tipos de polímeros descritos anteriormente (p.e., poli(vinilpiridinas) modificadas o sin modificar, alcoholes polivinílicos, poliaminas, poliácidos, etc.), nanopartículas añadidas (p.e., nanopartículas de látex modificadas en su superficie). Un material adicional a la pasta puede ser un agente de entrecruzamiento, Figura 1d, y que rápidamente forma uniones covalentes con la matriz de unión y/o las micropartículas conductoras (p.e., un diepóxido, una carbodiimida activada, un aldehído, una poliaziridina u otro agente di o multifuncional).

Los electrodos resultantes presentan alta permeabilidad y permiten flujos altos de sustrato en su seno. Dado que el área activa del electrodo no está limitada por la superficie expuesta sino, mas bien, por el volumen de la pasta, los electrodos descritos en esta invención son definidos como **electrodos de “fases”** en vez de simplemente electrodos. El volumen activo del electrodo puede ser fácilmente prolongado hasta una longitud de 0,5 cm lo que proporciona, para una superficie de exposición limitada, una elevada área superficial electroactiva en el seno de la fase del electrodo y en la que el transporte de materia del analito no está limitado, manteniéndose inalterada la consistencia de la fase y por consiguiente los instrumentos obtenidos son resistentes.

Alternativamente, para la construcción de las fases del electrodo se pueden utilizar polímeros de unión de naturaleza hidrófoba utilizando para su mezcla un disolvente hidrófobo. Dicha configuración puede resultar útil en el caso de que haya necesidad de un flujo de analito elevado cuando la matriz analítica sea de naturaleza apolar, o cuando se requiera efectuar una partición selectiva de un analito apolar desde una matriz acuosa a la fase hidrófoba del electrodo.

De especial interés práctico son los diseños en los que las fases de dichos electrodos son utilizadas para la construcción de biosensores. En estos casos, la capacidad de bioreconocimiento selectivo del electrodo puede ser introducida mediante la adición, en la mezcla de la fase del electrodo, de un elemento de bioreconocimiento (enzima, anticuerpo, célula, receptor, nucleótido, etc.) y la adición opcional de una sustancia que puede actuar como agente de transferencia de electrones (p.e., ferrocenos, complejos metálicos, citocromos, etc.). Estos componentes pueden ser añadidos directamente a la pasta sin temor a su desactivación ya que el microambiente de la pasta es compatible con su actividad (especialmente para la sustancia biológica). Otros ejemplos de aplicaciones en los que estos electrodos pueden ser útiles incluyen (sin estar limitados a los mismos) sensores potenciométricos selectivos a iones en los que los componentes responsables de la selectividad pueden ser incorporados en el seno de dichas fases de los electrodos.

La configuración de los electrodos inventada

es muy fácil de manufacturar mediante técnicas de impresión en pantalla "screen printing" o impresión por chorro "jet printing". La configuración es muy versátil y permite la adición de materiales tixotrópicos para facilitar la impresión en pantalla "screen printing" o agentes que disminuyan la viscosidad para la impresión por chorro "jet printing".

Desde un punto de vista más básico, las ventajas fundamentales de esta configuración estriban en que permite un intercambio de electrones muy rápido y que el transporte de la(s) sustancia(s) en el seno de las fases es igualmente muy rápido. Esto supone que no sólo el analito tiene acceso a una gran área superficial electrocatalítica, sino que también se favorece el que las sustancias incluidas en las fases del electrodo se muevan y reaccionen libremente alcanzando las máximas velocidades de transferencia de electrones. Todos los componentes son, a su vez, mantenidos en íntimo contacto en las fases debido a las intensas interacciones con la fase polimérica de unión la cual puede ser modificada específicamente para las distintas sustancias. Dado que la señal resultante de la electrooxidación o electroreducción del analito está limitada por el flujo de dicho analito a la fase del electrodo, la respuesta de los instrumentos basados en estos electrodos de fase es altamente reproducible y proporciona elevadas densidades de corriente. Por estas razones, estos instrumentos no son muy dependientes de las cantidades relativas de elementos transductores y de reconocimiento (en el caso de los biosensores) y pueden ser miniaturizables permitiendo la incorporación de electrodos multianalitos en áreas superficiales pequeñas. Este hecho es una ventaja adicional y única frente a las configuraciones electrónicas desarrolladas hasta el momento. En muchas de ellas, la dependencia de la respuesta con el flujo del analito se establece externamente mediante la adición de una membrana cuyo único objetivo es limitar este flujo ya que los otros pasos en la cascada electrocatalítica son más lentos (p.e., véase: Matsushita Elec. Ind. (1989), JP 12112345, 5pp; Matsushita Elec. Ind. (1989), JP 63317096, 3pp; Andrieux, C.P., Audebert, P., Divisa-Blohorn, B., and Linquette-Maillet, S. (1993) *J. Electroanal. Chem.*, **353**, 289-96). En la configuración de esta invención, la integridad del electrodo y cualquier requerimiento para limitar el flujo del analito se realiza mediante un control del grado de entrecruzamiento del material de unión, proceso éste que es muy reproducible y que puede realizarse en la matriz y simultáneamente a la construcción del electrodo. El efecto del agente de entrecruzamiento en la estabilidad operacional del electrodo de fase y al que se ha incorporado una enzima se presenta en la Tabla 1. En general y para dicho efecto la fase de unión polimérica tiene que ser añadida en un porcentaje superior al 20% y el agente de entrecruzamiento en una proporción molar de al menos el 50% de los grupos funcionales con respecto al material de unión polimérico. En las Figuras 2, 3 y en la Tabla 1 se incluyen también los hallazgos más importantes que indican que la respuesta amperométrica estacionaria "steady state" de los electrodos inventados no está limitada por el intercambio de

electrones entre la enzima y el mediador sino mas bien por el transporte de materia del sustrato al electrodo o por la reacción de la enzima con el sustrato.

Para los objetivos de esta invención, los electrodos de fase inventados se denominan **electrodos de pasta unida**.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Representación esquemática de los electrodos de pasta unida (a) y un ejemplo del material de unión polimérico (b), un mediador redox (c) y un agente de entrecruzamiento (d).

Figura 2. Se compara el comportamiento electroquímico de un electrodo de pasta unida (B) con el comportamiento de un electrodo de pasta de carbono convencional (A) mediante un ciclo-voltamperograma de un mediador incorporado.

Figura 3. Se muestra la respuesta amperométrica estacionaria "steady state" de un electrodo de pasta unida en el que se ha incorporado a la fase la enzima glucosa oxidasa y un mediador redox.

Figura 4. Se muestra la respuesta amperométrica estacionaria "steady state" de un electrodo de pasta unida en el que se ha incorporado a la fase la enzima fructosa deshidrogenasa y un mediador redox.

Figura 5. Se muestra la respuesta en el modo de inyección en flujo para glucosa con un electrodo de pasta unida en el que se ha incorporado a la fase la enzima glucosa oxidasa y un mediador redox.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de un electrodo de pasta unida que incorpora una enzima y un mediador redox

Los electrodos de pasta unida se construyen mediante mezcla de 25 mg de polvo de grafito (Fluka, Merck Index 11,4444 pretratado por calentamiento a 700°C durante 90 s) con 5 mg de polímero de unión tal y como se muestra en la Figura 1b. Esta mezcla se homogeneiza en mortero junto con una mezcla de 1 mg de mediador (un ejemplo del mismo se muestra en la Figura 1c) y 1 mg de glucosa oxidasa o 5 mg de fructosa deshidrogenasa (ambas obtenidas de Sigma). La operación de mezcla en el mortero se favorece con la adición de aproximadamente 200 µL de agua para las cantidades descritas. La pasta resultante puede ser compactada en cualquier molde cilíndrico mediante una prensa o manualmente. En el caso de estos ejemplos, la pasta fue compactada manualmente en un molde cilíndrico de 3 mm de diámetro y suministrado por BAS (BioAnalytical Systems). El electrodo de pasta unida resultante se representa esquemáticamente en la Figura 1a en la que la accesibilidad del disolvente acuoso a través del volumen del electrodo también queda reflejada. El polímero de unión ha sido sintetizado tal y como ha sido descrito [Katakis, I. (1994) Ph. D. Thesis, The University of Texas at Austin, p. 27].

Ejemplo 2

Comparación de la eficiencia electrocatalítica de los electrodos de pasta unida con la obtenida con electrodos convencionales de pasta de carbono

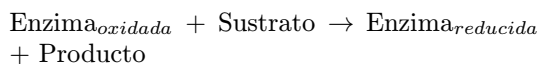
El mediador mostrado en la Figura 1c se incorpora en un electrodo de pasta unida y a un

electrodo convencional de pasta de carbono. Ambos electrodos se construyen mediante mezcla de la misma cantidad de mediador y grafito (1 mg de mediador por cada 25 mg de grafito Fluka pretratado como se ha descrito en el ejemplo 1). En el caso del electrodo de pasta unida la mezcla en el mortero se homogeneiza además con 5 mg de polímero (como el mostrado en la Figura 1b) y en el caso del electrodo de pasta de carbono se adicionan 10 μL de aceite de parafina (Fluka, Merck Index 11, 7139). Tras la compactación de las dos pastas en los respectivos moldes, se obtiene el ciclovoltamperograma de ambas configuraciones en una celda electroquímica convencional de 3 electrodos, en la que el electrodo de referencia es de Ag/AgCl saturado y el auxiliar es de platino. El electrolito soporte es tampón perclorato 0,25 M pH 6,5 y la velocidad de barrido 20 mV s^{-1} . Los resultados se muestran en la Figura 2. En la Figura 2A el electrodo convencional de pasta de carbono presenta una separación entre picos de más de 250 mV y una corriente en el pico de oxidación en tomo a los 14 μA (una vez restada la corriente de fondo). En contraste a este electrodo convencional, el electrodo de pasta unida presenta una onda casi reversible con una separación entre picos de unos 70 mV y una corriente en el pico de oxidación en tomo a los 100 μA . La elevada corriente obtenida indica que en el electrodo de pasta unida el área superficial electrocatalítica disponible es mucho mayor que en el electrodo convencional. La pequeña separación entre picos indica que la transferencia de electrones no está inhibida, fenómeno que no se cumple en los electrodos convencionales en los que se observa una gran separación entre picos (de acuerdo con lo descrito en la bibliografía) debida a una intensa adsorción a la fase hidrófoba o a un fuerte proceso de asociación iónica resultando en el paso límite de la respuesta [Dalton, E.F., Surridge, N.A., and Murray, R. (1990) *Chem. Phys.*, **141** 143-151; Inzelt, G., and Szabo, L. (1980) *Electrochim. Acta*, **31**, 1381-1387; Bard, A.J., and Faulkner, L.R. (1980) *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons, New York].

Ejemplo 3

Construcción de biosensores enzimáticos basados en electrodos de pasta unida

Utilizando los procedimientos del ejemplo 1, se pueden construir biosensores basados en electrodos de pasta unida y su comportamiento compararse con los biosensores construidos mediante procedimientos convencionales. En general estos biosensores trabajan en el modo amperométrico de detección que consiste en la reoxidación de un mediador redox que ha sido reducido por una enzima en presencia de su sustrato. La secuencia general de las reacciones que conducen a una corriente de oxidación (cuando la enzima es una oxidasa o una deshidrogenasa) es:



La última reacción se produce en la superficie del electrodo y los electrodos obtenidos proporcionan una corriente de oxidación que es proporcional a la concentración de sustrato (analito).

5.a. Biosensores de glucosa

Los electrodos de pasta unida son construidos como en el ejemplo 1. Los electrodos convencionales de pasta de carbono se construyen sin adición de polímero de unión pero incluyen en su lugar 10 μL de aceite de parafina antes de la homogeneización de la pasta consistente en 25 mg de polvo de grafito y 1 mg de mediador. En ambos casos, se añaden 1 mg de glucosa oxidasa (Sigma tipo X-S) respectivamente. Se han usado dos tipos de mediadores para demostrar que la utilización del mediador más hidrófilo mejora la respuesta de los electrodos enzimáticos. En la configuración B el mediador que se añade es el que se muestra en la Figura 1c. En la configuración A el mediador utilizado es el mostrado en el recuadro de la Figura 3. Las curvas de respuesta obtenidas en régimen estacionario "steady state" para sucesivas adiciones de glucosa se muestran en la Figura 3a (para los electrodos de pasta unida) y 3b (para los electrodos convencionales de pasta de carbono). Estas curvas de respuesta se obtienen de la siguiente manera: en una celda electroquímica convencional de 3 electrodos, con agitación vigorosa, en saturación de nitrógeno y termostatación a 27°C; el electrodo de trabajo con un diámetro de 3 mm se introduce en la celda y se aplica un potencial de 100 mV frente al saturado de Ag/AgCl para la configuración B y a 400 mV para la configuración A. El electrolito soporte es tampón perclorato 0,25 M a pH 6,5. Una vez que el valor de la corriente de fondo se ha estabilizado, se añade glucosa a las concentraciones mostradas esperando a que la corriente se estabilice antes de la adición siguiente.

La Figura 5 muestra, en el modo de trabajo por inyección en flujo, los picos resultantes tras inyecciones consecutivas de una disolución 40 mM de glucosa, obtenidos con un electrodo de pasta unida de 3 mm como el descrito anteriormente en la configuración A. La velocidad de flujo es de 1 mL min^{-1} y el volumen de inyección 20 μL con el mismo portador que el electrolito soporte descrito.

5.b. Biosensores de fructosa

Se utiliza el mismo procedimiento que en el ejemplo 3a para la construcción de los biosensores de fructosa, con la salvedad que la enzima utilizada es fructosa deshidrogenasa dependiente de PQQ. La enzima se añade en una cantidad de 5 mg para cada 25 mg de grafito y a partir de una disolución de enzima de 25 mg mL^{-1} en tampón acetato 0,1 M pH 5 conteniendo 0,1 % Triton X-100. La respuesta de estos electrodos a las diferentes concentraciones de fructosa se muestra en la Figura 4 siendo las condiciones de las medidas las mismas a las del Ejemplo 3a. La configuración A es la de un electrodo convencional de pasta de carbono y la B la de pasta unida. Figura 4a representa electrodos de 3 mm de diámetro con incorporación del mediador del recuadro de la Figura 3 y la Figura 4b electrodos de 1 mm de diámetro

con incorporación del mediador de la Figura 1c. Ejemplo 4.

Optimización de los biosensores basados en electrodos de pasta unida mediante entrecruzamiento y aplicación de bajos potenciales de trabajo

La configuración de electrodos de pasta unida ofrece una elevada área superficial electroactiva que resulta en una fase muy porosa desde la cual el elemento de bioreconocimiento y el mediador podrían escaparse o liberarse al medio de la disolución. La elevada área superficial supone que se pueden obtener corrientes de fondo elevadas (corrientes para una disolución "blanco" control). Ambos problemas se pueden soslayar tal y como se demuestra en los datos de la Tabla 1. Se demuestra que con la incorporación de una sustancia de entrecruzamiento (como la mostrada en la Figura 1d) la rigidez y por tanto la estabilidad del biosensor se mejora fácilmente y las corrientes de fondo disminuyen con la incorporación de un mediador cuyo potencial redox es menor (p.e. Osmio bis(4,4'-dimetil-bipiridina) (1-propilamino imidazol) cloruro referido como OsDMEI en Tabla 1).

Descripción detallada de la invención

La composición conductora de electrones, en forma de pasta, adecuada para fabricar electrodos y sensores, proporcionada por esta invención, en ocasiones también denominada en esta descripción "pasta conductora", comprende un material conductor en forma de partículas que se mantienen unidas por medio de una sustancia polimérica de unión (polímero de unión) en una matriz que puede ser modificada para incluir elementos de reconocimiento biológico y químico y/o mediadores electroquímicos. En particular, dicha composición en forma de pasta comprende un material conductor en forma de partículas y una sustancia polimérica de unión en una cantidad de, al menos, un 10 % en peso respecto al total de la composición.

El material conductor permite el flujo de electrones a través de la composición conductora en forma de pasta y se encuentra en forma de partículas con un tamaño medio comprendido entre 100 nanómetros (nm) y 100 micrómetros (μm). En general, dicho material conductor se selecciona del grupo formado por:

a) un material a base de carbono, bien suministrado como tal, por ejemplo, partículas de carbono, piezas de carbono vítreo; o bien formado *in situ*, por ejemplo, mediante pirólisis de materiales orgánicos a temperaturas elevadas o por oxidación ácida o electroquímica;

b) un material carbonáceo como el descrito en el apartado a) que ha sido modificado para incluir diversas funcionalidades por tratamiento químico, electroquímico, por radiación o con plasma;

c) partículas de metales, preferentemente metales de los grupos IB y VIII del Sistema Periódico de los Elementos, más preferentemente, plata, oro, hierro, cobalto, níquel, platino o sus mezclas, bien suministradas como tales, o bien por electrodeposición de las respectivas sales metálicas;

d) partículas de óxidos metálicos, conductores o semiconductores, tales como óxido de rutenio, óxido de estaño, y similares, mezclados y obtenidos electroquímicamente *in situ*;

e) partículas de carbono metalizado; y

f) combinaciones de dichos materiales a) - e)

Preferentemente, el material conductor comprende partículas de carbono, partículas metálicas o partículas de carbono metalizadas. En una realización preferida de esta invención, dicho material conductor comprende carbono o grafito, opcionalmente modificado por tratamiento con plasma, oxidación química o electroquímica; partículas de metales nobles directamente añadidas a la matriz, que comprende la sustancia polimérica de unión, o depositadas sobre ella por vía electroquímica; o combinaciones de partículas de carbono o grafito, opcionalmente modificado, con partículas metálicas.

La sustancia polimérica de unión proporciona estabilidad mecánica e integridad al material conductor permitiendo al mismo tiempo un movimiento libre de analitos y aditivos a través de la pasta conductora. La sustancia polimérica de unión puede comprender un polímero hidrófilo o, alternativamente, un polímero hidrófobo, según la aplicación. En general tales polímeros pueden contener funcionalidades que interaccionan con las partículas conductoras y/o grupos que pueden ser entrecruzados fácilmente, o bien pueden ser modificados químicamente para introducir tales grupos o funcionalidades, así como para aumentar su carácter hidrófilo o hidrófobo. Dicha sustancia polimérica de unión también puede contener opcionalmente, proteínas o polipéptidos naturales, sintéticos o recombinantes, en una cantidad superior al 5 % en peso respecto al total de la composición, así como nanopartículas añadidas, tales como, nanopartículas de látex modificadas en su superficie para introducir, por ejemplo, alguna funcionalidad de unión al material conductor o al polímero.

En una realización particular, cuando la pasta conductora va destinada a la fabricación de electrodos y sensores que operan en un medio acuoso, por ejemplo, sangre, caldos de fermentación, afluentes industriales, etc., o alternativamente en un medio orgánico, la sustancia polimérica de unión utilizada para la elaboración de la pasta conductora comprende un polímero hidrófilo, opcionalmente acompañado de una proteína o de un polipéptido natural, sintético o recombinante, soluble en agua o en disolventes acuosos. Como polímero hidrófilo puede utilizarse, en general, cualquier polímero, sintético o natural, lineal o ramificado, soluble en agua o en disolventes acuosos con un peso molecular comprendido entre 10 y 500 kilodaltons (kDa), que posee todas o alguna de las siguientes características:

a) funcionalidades que permitan un entrecruzamiento eficaz de la sustancia polimérica de unión y/o la fase conductora, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, anhídridos y aldehídos y/o

b) funcionalidades que mejoran las interacciones de la sustancia polimérica de unión con la fase conductora, por ejemplo, anillos aromáticos, tioles, sulfhidrilos; y/o

c) grupos modificadores que también pueden ser incluidos en la fase conductora por interacciones electrostáticas y/o por puentes de hidrógeno, por ejemplo, grupos cargados, tales como grupos

amonio cuaternario, y amidas.

Ejemplos de tales polímeros hidrófilos pueden ser polietileniminas lineales o ramificadas, opcionalmente derivatizadas, así como los polímeros de vinilpiridina [poli(vinilpiridina)], opcionalmente funcionalizados con grupos amina, tal como se muestra en la Figura 1b, donde un determinado número de piridinas han sido cuaternizadas con etilaminas. Opcionalmente, dicho polímero puede estar acompañado de una proteína o de un polipéptido, tal como una albúmina de cualquier origen (plasma, leche, huevo), en cuyo caso, dicha proteína o polipéptido puede estar presente en una cantidad superior al 5 % en peso respecto al total de la composición.

Por otra parte, cuando la pasta conductora va destinada a la fabricación de electrodos y sensores que operan en un medio hidrófobo, porque el analito o el mediador o el elemento de reconocimiento del sensor requiera un entorno hidrófobo, o que operan en un medio hidrófilo cuando la consistencia del electrodo se haya logrado mediante una pasta hidrófoba o el analito se reparta más eficazmente en una pasta hidrófoba, entonces la sustancia polimérica de unión utilizada para la elaboración de la pasta conductora comprende un polímero hidrófobo en agua y en disolvente acuoso, con un peso molecular comprendido entre 10 y 1000 kDa, opcionalmente provisto de funcionalidades que aumentan su carácter hidrófobo, por ejemplo, funcionalidades de tipo éter o anillos aromáticos que, opcionalmente, pueden contener, al menos, un heteroátomo.

Entre dichos polímeros hidrófobos se encuentran el poliestireno lineal, la poli(vinilpiridina) sin derivatizar, la celulosa y el quitosano. Opcionalmente, dicho polímero hidrófobo puede ir acompañado de colágeno en una cantidad de hasta un 10 % en peso respecto al total de la composición.

Alternativamente, si se desea aumentar su resistencia mecánica, la composición conductora en forma de pasta proporcionada por esta invención, también puede contener, opcionalmente, un agente de entrecruzamiento, en una proporción molar de, al menos, el 20 % de los grupos funcionales con respecto al material de unión polimérico. Como agente de entrecruzamiento puede utilizarse cualquier compuesto capaz de formar uniones covalentes con la sustancia polimérica de unión y/o con las partículas del material conductor. En una realización particular, dicho agente de entrecruzamiento se selecciona del grupo formado por una sustancia bi- o multifuncional que puede reaccionar fácilmente con las funcionalidades de los polímeros, mencionadas previamente, en disolventes acuosos u orgánicos, tales como aziridinas bi- y polifuncionales, di- y poliepóxidos, di- y poli- aldehídos, polioles conteniendo grupos hidroxilos vecinales, carbodiimidas activadas, di- y poliaminas, y di- y politioles.

La pasta conductora proporcionada por esta invención puede ser obtenida fácilmente por mezcla de las cantidades adecuadas de los distintos componentes, preferentemente en presencia de una pequeña cantidad de agua ya que mejora la homogeneidad de la mezcla. La pasta resultante permite el flujo tanto de electrones como de ma-

teria (analito, reactivos, productos) por lo que puede ser utilizada para la fabricación de electrodos y sensores. Para ello, a la formulación de la pasta conductora de esta invención se le pueden añadir los correspondientes mediadores electroquímicos y/o elementos de reconocimiento biológico o químico, en las cantidades adecuadas, obteniéndose una pasta conductora modificada por la incorporación de tales compuestos, que presenta unas características reológicas que permiten su manejo y procesamiento por técnicas de moldeo o impresión serigráfica o por chorro para fabricar electrodos y sensores.

La invención también proporciona un electrodo que comprende la composición conductora de electrones, en forma moldeada y compactada manualmente o con ayuda de una prensa o alternativa y preferentemente mediante el empleo de técnicas de impresión serigráfica o por chorro. Opcionalmente, la pasta conductora utilizada para la fabricación del electrodo puede contener además del material conductor en forma de partículas y la sustancia polimérica de unión, un mediador o transductor electroquímico, es decir, una sustancia capaz de transferir electrones, de los utilizados habitualmente, que presente un potencial redox desde -0,7 a +0,5 Voltios frente al electrodo saturado de calomelanos, tal como un complejo metálico, por ejemplo, dicloruro de osmio bis(bi-piridina) y sus derivados, ferrocenos y otros metalocenos, y complejos de rutenio; una proteína de bajo peso molecular, tal como citocromo c; una sustancia quinoide; una sustancia que contenga un anillo fenazonio en su estructura; o un polímero con actividad redox.

Adicionalmente, la invención proporciona un sensor que comprende la composición conductora de electrones, en forma de pasta, previamente definida, junto con un elemento de reconocimiento químico o biológico y/o un mediador. El término "sensor", cuando no se especifica nada más, incluye tanto a los sensores químicos como a los sensores biológicos o biosensores.

El término "sensor químico", en el sentido utilizado en esta descripción se refiere a un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento químico íntimamente conectado o integrado a un transductor electroquímico. Por tanto, la pasta conductora utilizada para la fabricación de dicho sensor químico contiene, además del material conductor en forma de partículas y la sustancia polimérica de unión, un elemento de reconocimiento químico, junto con, opcional y ventajosamente, un mediador electroquímico tal como se ha definido previamente. El término "elemento de reconocimiento químico", en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a un material químico que tiene la capacidad de reconocimiento, e incluye materiales que permiten el intercambio o complejación selectivo de iones, tales como zeolitas, membranas y similares, que pueden ser utilizados para detectar y medir la presencia de determinados iones en una muestra a analizar o complejos de cobre, cobalto, rutenio con piridina, imadazoles, poliaminas, etc. En una realización particular, la invención proporciona un sensor químico que contiene un cóctel selectivo a iones en los que los componentes responsables de

dicha selectividad están incorporados en el seno de la pasta conductora. El fluoruro, sulfuro, sulfuroso así como el ión plata constituyen ejemplos de iones de interés.

El término "biosensor" o "sensor biológico", en el sentido utilizado en esta descripción se refiere a un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento biológico íntimamente conectado o integrado a un transductor electroquímico directamente o mediante químicas de transducción. Por tanto, la composición conductora utilizada para la fabricación de dicho biosensor contiene, además del material conductor en forma de partículas y la sustancia polimérica, de unión, un elemento de reconocimiento biológico junto con, opcional y ventajosamente, un mediador electroquímico tal como se ha definido previamente. El término "elemento de reconocimiento biológico", en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a un material bioquímico que tiene capacidad de reconocimiento biológico (bioreconocimiento), es decir, que puede identificar o reconocer un analito mediante una reacción catalítica o de afinidad. El término "material bioquímico" incluye no sólo a productos que tienen la capacidad de replicarse directa o indirectamente, tales como células, bacterias, virus, plásmidos, órganos intactos de una planta, insecto o animal, sino también a productos (bio)químicos presentes en organismos vivos, por ejemplo, proteínas, enzimas, anticuerpos, hormonas, nucleótidos, oligo o polinucleótidos, receptores celulares y hormonales, o que pueden ser obtenidos por vía sintética, semisintética o recombinante. En una realización particular de esta invención, el elemento de reconocimiento biológico se selecciona del grupo formado por anticuerpos, enzimas, hormonas, nucleótidos, oligo o polinucleótidos, receptores celulares u hormonales, solos o combinados entre ellos. En una realización particular y preferida de esta invención, el elemento de reconocimiento biológico es una enzima, preferentemente una óxido-reductasa o un anticuerpo o un anticuerpo marcado o una sonda de oligonucleótido.

Alternativamente, dichos sensores pueden contener un elemento de reconocimiento modificado covalentemente con un mediador, o con grupos que proporcionan estabilidad o funcionalidades de entrecruzamiento, o con marcadores fluoróforos o enzimáticos.

Los electrodos y sensores proporcionados por esta invención pueden acoplarse a cualquier dispositivo convencional de detección y tratamiento de la señal, de forma que pueden responder en cualquier modo de operación, por ejemplo, potenciométrico, conductimétrico, amperométrico (en cualquier modo, cronoamperometría en régimen estacionario, corrientes de medida Cottrell o tipo Cottrell con cualquier constante de tiempo) o en cualquier forma de integración de corriente, mediante coulombimetría o cronocoulombimetría. En una realización particular de esta invención, dicho electrodo presenta una respuesta amperométrica en régimen estacionario limitada por un transporte de materia del analito al electrodo siempre y cuando esa limitación no se establezca externamente mediante la incorporación de mem-

branas, mientras que en otra realización particular, dicho electrodo presenta una respuesta amperométrica en régimen estacionario limitada por la reacción del analito con el elemento biológico o químico de reconocimiento.

Los electrodos y sensores proporcionados por esta invención pueden construirse fácilmente mezclando los distintos componentes, en las cantidades apropiadas dependiendo de las características que se quieran conferir a tales dispositivos, preferentemente en presencia de una pequeña cantidad de agua o disolvente orgánico dependiendo de que se haya usado un polímero de unión hidrófilo o hidrófobo, en general comprendida entre el 1 % y el 30 % en peso respecto al total de la composición, y conformando la pasta resultante bien de forma manual, bien con ayuda de una prensa o bien, alternativa y preferentemente, mediante técnicas de impresión serigráfica o por chorro.

La mezcla puede hacerse sin necesidad de un control de humedad, aunque, en general, la adición de una pequeña cantidad de agua mejora la homogeneidad de la pasta resultante. A escala de laboratorio, la mezcla se puede realizar en un mortero, mientras que a escala industrial se puede usar un tambor de mezclado u otro equipo similar.

En general, cuando existe la necesidad de una capacidad de reconocimiento selectivo del electrodo o del sensor, ésta puede ser introducida mediante la adición a la mezcla del elemento de reconocimiento adecuado, así como mediante la adición opcional de un mediador. Estos componentes pueden ser añadidos directamente a la pasta conductora sin temor a su desactivación ya que el microambiente de la pasta es compatible con su actividad (especialmente para la sustancia biológica).

La pasta conductora resultante tras la mezcla de los componentes es muy fácil de manufacturar mediante técnicas de impresión serigráfica ("screen printing") o de impresión por chorro ("jet printing" o "dot printing"). Dicha pasta es muy versátil y permite la adición de materiales tixotrópicos para facilitar la impresión serigráfica o agentes que disminuyan la viscosidad para la impresión por chorro.

Desde el punto de vista más básico, las ventajas fundamentales de esta pasta conductora radican en que permite un intercambio de electrones muy rápido y que el transporte de la(s) sustancia(s) en el seno de la misma es igualmente muy rápido. Esto supone que no sólo el material (analito/sustrato) tiene acceso a una gran área superficial electrocatalítica, sino que también se favorece el que las sustancias incluidas en la pasta se muevan y reaccionen libremente alcanzando las máximas velocidades de transferencia de electrones. Todos los componentes son, a su vez mantenidos en íntimo contacto debido a las intensas interacciones con la sustancia polimérica de unión la cual puede ser modificada específicamente para las distintas sustancias. Dado que la señal resultante de la electrooxidación o electroreducción del analito está limitada por el flujo de dicho analito al dispositivo analítico, la respuesta de los instrumentos basados en estos electrodos y sensores es altamente uniforme y reproducible y propor-

ciona elevadas densidades de corriente. Por estas razones, estos instrumentos no son muy dependientes de las cantidades relativas de elementos transductores y de reconocimiento y pueden ser miniaturizables permitiendo la incorporación de sensores y electrodos multianalitos en áreas superficiales pequeñas, este hecho es una ventaja adicional y única frente a las configuraciones desarrolladas hasta el momento. En muchas de ellas, la dependencia de la respuesta con el flujo del analito se establece externamente mediante la adición de una membrana cuyo único objetivo es limitar este flujo ya que los otros pasos en la cascada electrolítica son más lentos (por ejemplo, véase: Matsushita Elec. Ind. (1989), JP 12112345; Matsushita Elec. Ind. (1989), JP 63317096; Andrieux C.P., Audebert, P., Divisa-Blohom, B., and Linquette-Maillet, S. (1993) *J. Electroanal. Chem.* **353**, 289-296). En la configuración de esta invención la estabilidad, firmeza, resistencia mecánica e integridad de la pasta conductora y cualquier requerimiento para limitar el flujo del analito se realiza mediante un control del grado de entrecruzamiento del material de unión, proceso éste que es muy reproducible y que puede realizarse en la matriz y simultáneamente a la construcción del electrodo o del sensor. El efecto del agente de entrecruzamiento en la estabilidad operacional de un electrodo al que se ha incorporado una enzima se muestra en la Tabla 1 [véase el Ejemplo 4]. En general, para observar dicho efecto el material polimérico de unión tiene que ser añadido, preferentemente, en un porcentaje superior al 20 % en peso respecto al total de la composición y el agente de entrecruzamiento en una proporción molar de, al menos, el 20 % de los grupos funcionales con respecto al material de unión polimérico. En las Figuras 2 y 3 y en la Tabla 1 se incluyen también los hallazgos más importantes que indican que la respuesta amperométrica en régimen estacionario de los biosensores proporcionados por esta invención no está limitada por el intercambio de electrones entre la enzima y el mediador sino más bien por el transporte de materia del sustrato al biosensor o por la reacción de la enzima con el sustrato.

Los electrodos y sensores proporcionados por esta invención presentan alta permeabilidad y permiten altos flujos de sustrato en su seno. Dado que el área activa de tales dispositivos no está limitada por la superficie expuesta sino, más bien, por el volumen de la pasta, los dispositivos descritos en esta invención pueden definirse como dispositivos de "fases". El volumen activo del electrodo o del sensor puede ser fácilmente prolongado hasta una "profundidad" [distancia desde la base] de 0,5 cm (centímetros) lo que proporciona, para una superficie de exposición limitada, una

elevada área superficial electroactiva en el seno de la fase del electrodo o del sensor y en la que el transporte de materia del analito no está limitado, manteniéndose inalterada la consistencia de la fase y por consiguiente los instrumentos obtenidos son estables y tienen resistencia mecánica.

Como puede apreciarse, mediante esta invención se introduce el concepto de fases de electrodos a base de materiales conductores en partículas. Basándose en esta configuración de fases se simplifica la manufactura de electrodos y sensores y se obtienen unos dispositivos fácilmente miniaturizables y reproducibles.

Los electrodos y sensores proporcionados por esta invención tienen numerosas aplicaciones en el campo del análisis y detección de analitos. Así tales instrumentos pueden utilizarse para detectar compuestos o iones de interés en una muestra, lo que puede tener aplicaciones analíticas básicas con fines investigadores, así como aplicaciones analíticas de diagnóstico, sanitarias o medioambientales.

Por tanto, la invención también proporciona un instrumento analítico que contiene, al menos, un electrodo o sensor proporcionado por la invención. En una realización particular, dicho instrumento analítico está basado en una configuración de celda electroquímica de dos electrodos donde un electrodo es un combinado de referencia auxiliar y el otro electrodo comprende uno o más electrodos proporcionados por esta invención. En otra realización particular, dicho instrumento comprende unos electrodos proporcionados por esta invención que trabajan en una configuración de celda electroquímica con dos electrodos, donde un electrodo es una fuente de electrones y el otro es un colector de electrones, y un mediador responsable del transporte de electrones de un electrodo a otro. Alternativamente, en otra realización de esta invención, se proporciona un instrumento analítico basado en una configuración de celda electroquímica con tres electrodos, donde un electrodo es de referencia, otro es un auxiliar y el tercero comprende uno o más electrodos de trabajo de los proporcionados por esta invención.

Finalmente, la invención también proporciona un equipo electroquímico que comprende, al menos, un electrodo o sensor proporcionados por esta invención. En una realización particular, dicho equipo, que permite el flujo a través de su seno, comprendiendo su seno una de las configuraciones de los electrodos de la presente invención que puede o no incorporar un elemento de reconocimiento químico o biológico, puede ser utilizados con fines de detección (por ejemplo, en un inmunosensor de flujo).

REIVINDICACIONES

1. Una composición conductora de electrodos, en forma de pasta, que comprende un material conductor en forma de partículas que se mantienen unidas por una sustancia polimérica de unión en una cantidad de, al menos, un 10 % en peso respecto al total de la composición, en una matriz que puede ser adicionalmente modificada para incluir elementos de reconocimiento químico o bioquímico y/o mediadores electroquímicos y un agente de entrecruzamiento.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el material conductor en forma de partículas se selecciona del grupo formado por:

- a) un material a base de carbono, opcionalmente modificado para incluir diversas funcionalidades;
- b) partículas de metales o de óxidos metálicos, conductores o semiconductores;
- c) partículas de carbono metalizado; y
- d) combinaciones de dichos materiales a) - c).

3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho material a base de carbono comprende partículas de carbono, partículas de grafito, piezas de fibra de carbono, piezas de carbono vítreo, opcionalmente modificadas para incluir diversas funcionalidades por tratamiento químico, electroquímico, por radiación o con plasma.

4. Composición según la reivindicación 2, en la que dicho material a base de carbono se forma in situ por pirólisis de materiales orgánicos o por oxidación ácida o electroquímica, y puede ser opcionalmente modificado para incluir diversas funcionalidades por tratamiento químico, electroquímico, por radiación o con plasma.

5. Composición según la reivindicación 2, en la que dichas partículas metálicas se seleccionan a partir de los metales de los grupos IB y VIII del Sistema Periódico de Elementos, preferentemente, plata, oro, hierro, cobalto, níquel, platino o sus mezclas.

6. Composición según la reivindicación 2, en la que dichas partículas de óxido metálico comprenden óxido de rutenio, óxido de estaño y sus mezclas.

7. Composición según la reivindicación 1, en la que la sustancia polimérica de unión comprende un polímero hidrófilo, soluble en agua o en disolventes acuosos, con un peso molecular comprendido entre 10 y 500 kDa que posee todas o alguna de las siguientes características:

- a) funcionalidades que permitan un entrecruzamiento eficaz de la sustancia polimérica de unión y/o la fase conductora, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, anhídridos y aldehídos; y/o
- b) funcionalidades que mejoran las interacciones de la sustancia polimérica de unión con la fase conductora, por ejemplo, anillos aromáticos, tioles, sulfhidrilos; y/o

- c) grupos modificadores que también pueden ser incluidos en la fase conductora por interacciones electrostáticas y/o por puentes de hidrógeno, por ejemplo, grupos cargados y amidas,

junto con, opcionalmente una proteína o polipéptido soluble en agua y en disolventes acuosos.

8. Composición según la reivindicación 7, en la que dicho polímero hidrófilo es una polietilenoimina lineal o ramificada, opcionalmente derivatizada o un polímero de vinilpiridina [poli(vinilpiridina)], opcionalmente funcionalizados con grupos amina.

9. Composición según la reivindicación 1, en la que la sustancia polimérica de unión comprende un polímero hidrófobo, sintético o natural, lineal o ramificado, insoluble en agua y en disolventes acuosos, con un peso molecular comprendido entre 10 y 1000 kDa, opcionalmente provisto de funcionalidades que aumentan su carácter hidrófobo, junto con, opcionalmente, una proteína o un polipéptido insoluble en agua y en disolventes acuosos.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en las que dicha sustancia polimérica de unión comprende, además, nanopartículas de látex modificadas en su superficie para introducir alguna funcionalidad de unión al material conductor o al polímero.

11. Composición según la reivindicación 1, que comprende además un agente de entrecruzamiento, en una proporción molar de, al menos, el 20 % de los grupos funcionales con respecto al material de unión polimérico, seleccionado del grupo formado por una sustancia bi- o multifuncional que puede reaccionar fácilmente con las funcionalidades de los polímeros, mencionadas previamente, en disolventes acuosos u orgánicos, tales como aziridinas bi- o polifuncionales, di- o poliepóxidos, di- y polialdehídos, polioles conteniendo grupos hidroxilo vecinales, carbodiimidas activadas, di- y poliaminas, y di- y politioles.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en las que el mediador redox electroquímico se selecciona del grupo formado por complejos metálicos, proteínas de bajo peso molecular capaces de transferir electrones, sustancias quinoides, sustancias que contengan un anillo fenazonio en su estructura, o polímeros con actividad redox, presentando potenciales redox desde -0,7 a +0,5 Voltios frente al electrodo saturado de calomelanos.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en las que el elemento de reconocimiento químico es un cóctel selectivo a iones o complejos metálicos capaces de catalizar reacciones con el analito.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en las que el elemento de reconocimiento biológico es un material biológico que puede selectivamente identificar e interactuar con el analito a través de una reacción catalítica o de afinidad.

15. Composición según la reivindicación 14 en la que dicho elemento de reconocimiento biológico es un material biológico que tiene la capacidad de replicarse directa o indirectamente.

16. Composición según la reivindicación 14 en la que dicho elemento de reconocimiento biológico es un material bioquímico presente en un organismo vivo, opcionalmente obtenible por vía sintética, semisintética o recombinante.

17. Composición según la reivindicación 16 en la que dicho elemento de reconocimiento biológico se selecciona del grupo formado por anticuerpos, enzimas, hormonas, nucleótidos, oligo o polinucleótidos, receptores celulares u hormonales.

18. Composición según la reivindicación 17 en la que dicho elemento de reconocimiento biológico es una enzima óxido-reductasa.

19. Composición según la reivindicación 14 en la que dicho elemento de reconocimiento biológico se modifica covalentemente con un mediador, o con grupos que proporcionan estabilidad o funcionalidades de entrecruzamiento, o con marcadores fluoróforos o enzimáticos.

20. Electrodo que comprende una composición conductora de electrones, en forma de pasta, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Electrodo según la reivindicación 20, acoplado a un dispositivo de detección y tratamiento de la señal, de forma que responda en un modo de operación seleccionado del grupo formado por potenciométrico, conductimétrico, amperométrico (en cualquier modo, cronoamperimetría en régimen estacionario, corrientes de medida Cottrell o tipo Cottrell con cualquier constante de tiempo), o en cualquier forma de integración de corriente, coulombimetría o cronocoulombimetría.

22. Electrodo según la reivindicación 21, que presenta una respuesta amperométrica en régimen estacionario limitada por un transporte de materia del analito a la fase del electrodo siempre y cuando esa limitación no se establezca externamente mediante la incorporación de membranas.

23. Electrodo según la reivindicación 21, que presenta una respuesta amperométrica en régimen estacionario limitada por la reacción del analito con el elemento biológico o químico de reconocimiento.

24. Un sensor que comprende una composición conductora de electrones, en forma de pasta, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a

19, junto con un elemento de reconocimiento químico o biológico y/o un mediador.

25. Un sensor según la reivindicación 24, acoplado a un dispositivo de detección y tratamiento de la señal, de forma que responda en un modo de operación seleccionado del grupo formado por potenciométrico, conductimétrico, amperométrico (en cualquier modo, cronoamperimetría en régimen estacionario, corrientes de medida Cottrell o tipo Cottrell con cualquier constante de tiempo), o en cualquier forma de integración de corriente, coulombimetría o cronocoulombimetría.

26. Un procedimiento para construir electrodos según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 o sensores según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25, que comprende:

mezcla del material conductor en forma de partículas, de la sustancia polimérica de unión, del agente de entrecruzamiento y del mediador en presencia de un 1 a 20% en peso respecto al total de la composición de agua o disolvente orgánico dependiendo de que se haya usado respectivamente un polímero hidrófilo o hidrófobo; y

conformar la pasta resultante de forma manual o con ayuda de una prensa, o bien mediante técnicas de impresión serigráfica o por chorro.

27. Un instrumento analítico basado en una configuración de celda electroquímica de dos electrodos donde un electrodo es un combinado de referencia-auxiliar y el otro electrodo comprende, al menos, un electrodo de trabajo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.

28. Un instrumento analítico basado en una configuración de celda electroquímica de tres electrodos donde un electrodo es de referencia, otro es un auxiliar y el tercero comprende, al menos, un electrodo de trabajo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.

29. Un equipo electroquímico que permite el flujo a través de su seno, que comprende un electrodo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 o un sensor según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, adecuado para la detección de un analito.

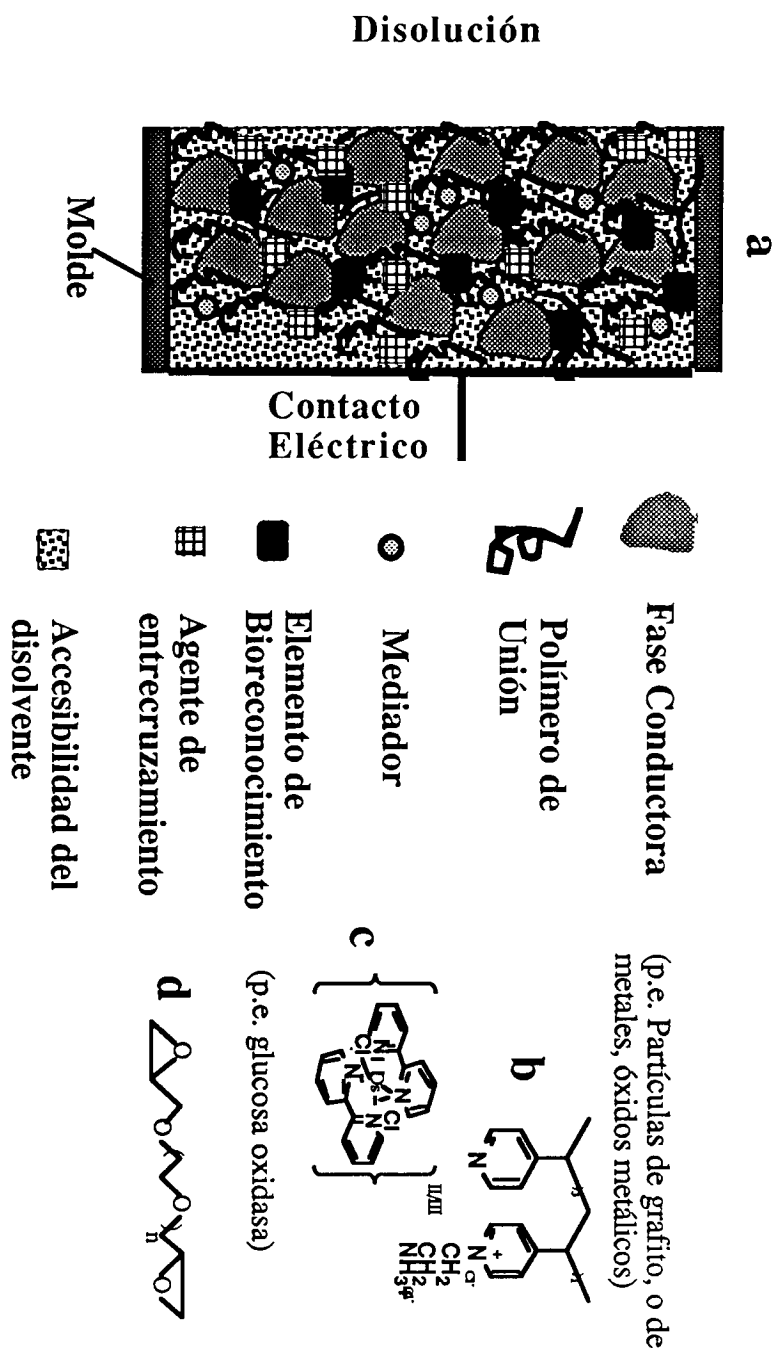


Figura 1

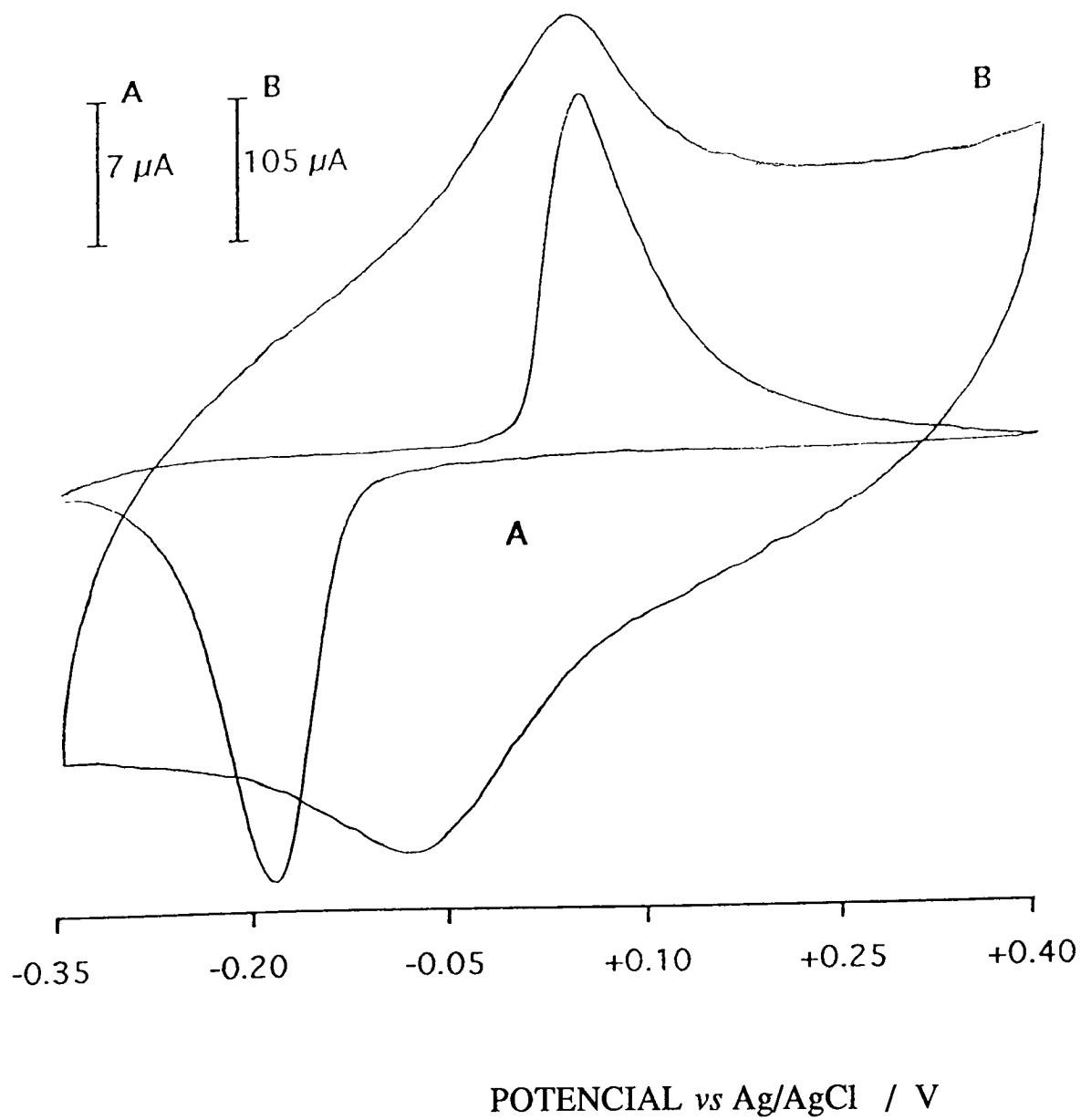


Figura 2

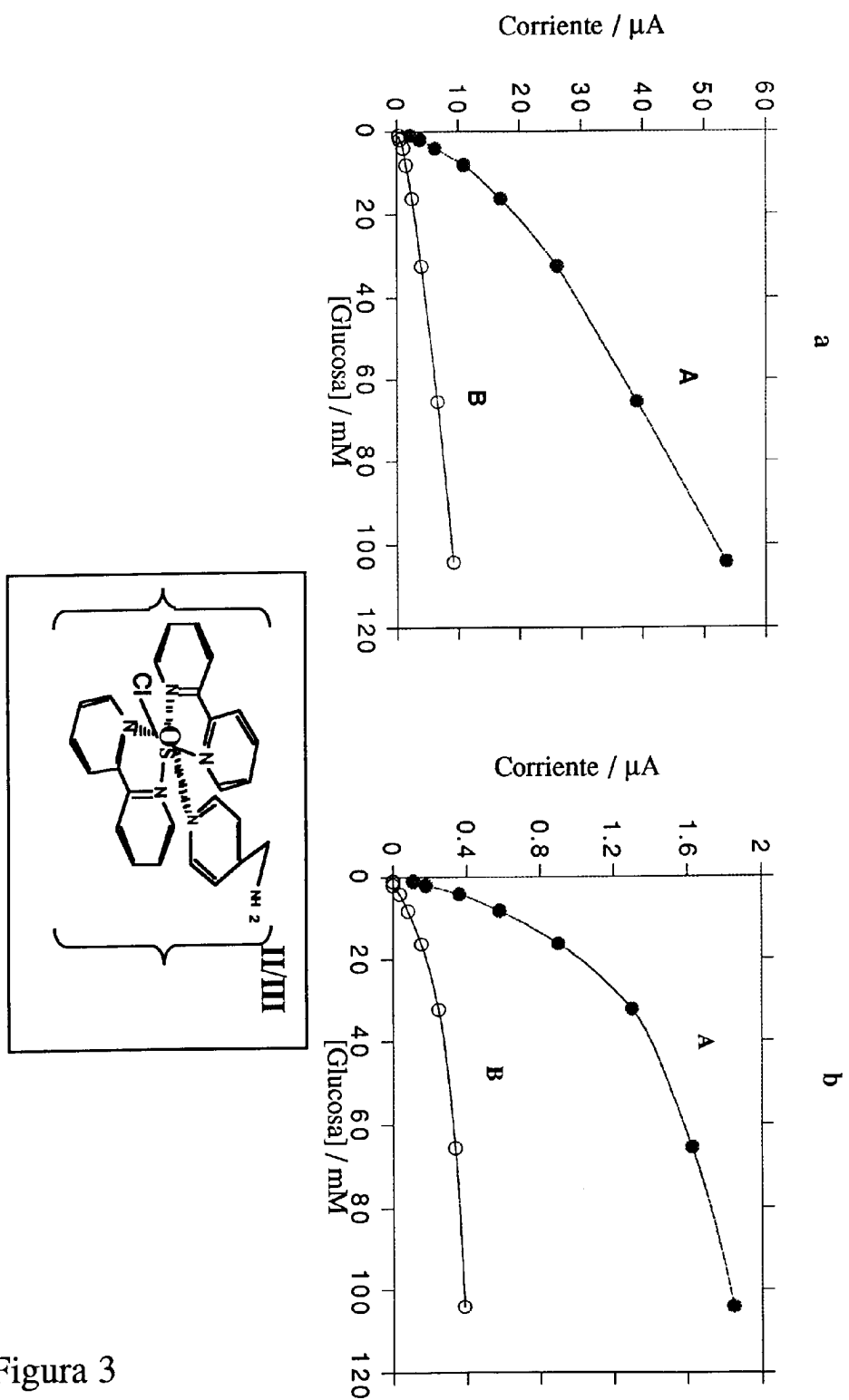


Figura 3

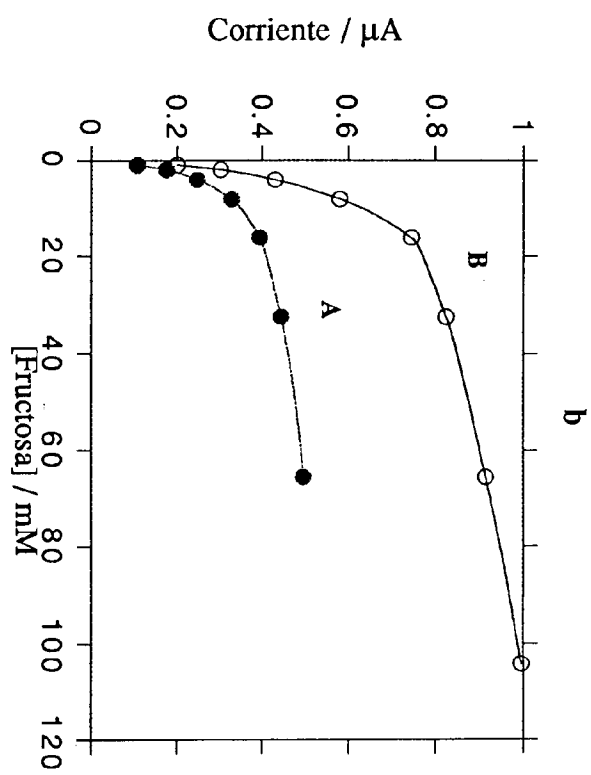
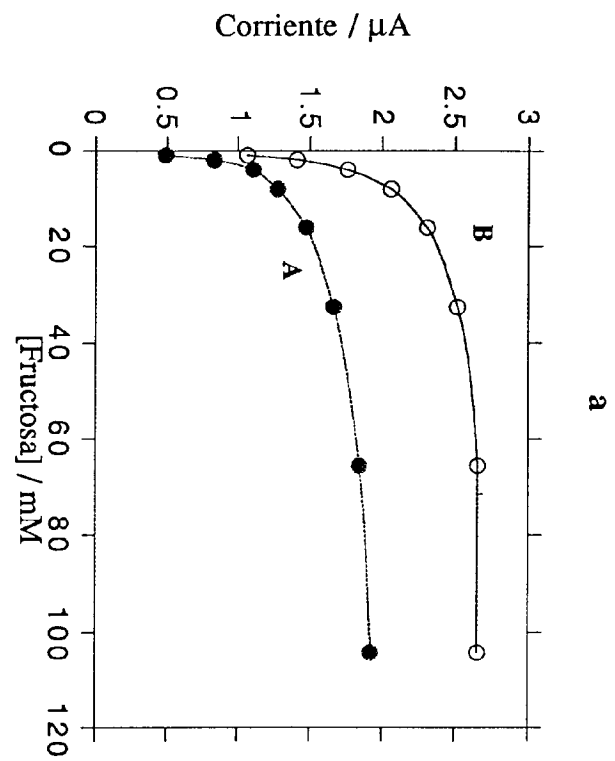


Figura 4

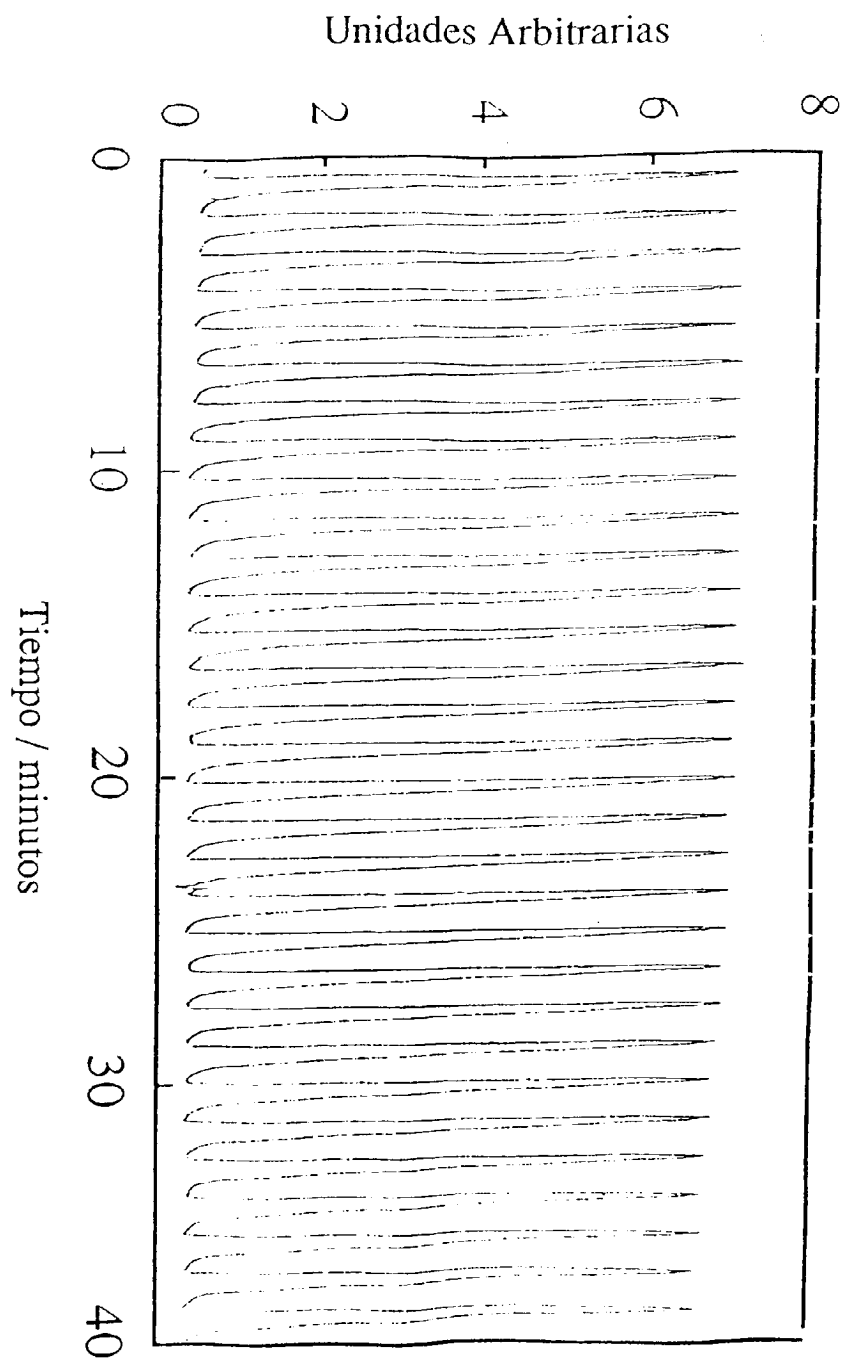


Figura 5

Tabla 1. Características Generales de los Electrodo Enzimáticos

Tipo de Electrodo	Mediador / Potencial de Trabajo (V)	Aparente Km (mM)	Corriente de Fondo (μA)*	% Pérdida de Corriente por Aire**	Densidades de Corriente Catalítica†	Variación de la Corriente por Agitación††	Tiempo de Vida Medio con Agit. (horas)
PC-GOx	Figura 1c/0.1	26±3	≈0.2	?	5.7±1.1	0	≈3
PU-GOx	Figura 1c/0.1	32±4	≈1.5	?	142±28	0	≈2
PC-GOx	Figura 3rec/0.4	20±4	≈0.2	54	28±8	0	?
PU-GOx	Figura 3rec/0.4	>60	≈14	29	850±250	27%	≈2
PU-GOx	Figura 3rec/entrecr./0.4	21±4	≈17	9	750±120	33%	>12
PU-GOx	OsDMEI/0.1	32±6	1.5	28	212	7%	1
PC-FDH	Figura 1c/0.1	4.1±0.2	0.25	-	127±25	?	1.7
PU-FDH	Figura 1c/0.1	2.2±0.5	3.3	-	38±7	?	1.2

PU: Pasta Unida, PC: Pasta Convencional, GOx: Glucosa Oxidasa, FDH: Fructosa Deshidrogenasa

Aparente Km es aproximada y está referida a la concentración a la que se alcanza la mitad de la corriente de saturación.

* Referida a un electrodo de 3 mm al potencial de trabajo y tras una hora de estabilización.

** Referida al % de pérdida de corriente cuando la atmósfera en la celda se cambia de nitrógeno a aire a una concentración 6 mM de glucosa.

† Densidades de corriente ($\mu\text{A cm}^{-2}$) aparentes para las áreas superficiales geométricas con concentraciones de saturación de glucosa.

†† Pérdida de corriente observada cuando las condiciones de medida se cambian de una agitación vigorosa a sin agitación a una concentración 6 mM de glucosa.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 103 197
⑫ N.º solicitud: 9501590
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **04.08.95**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: G01N 27/26

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-9323744-A (HELLER, ADAM et al.) 25.11.93	
A	US-4927516-A (YAMAGUCHI et al.) 22.05.90	
A	US-4545382-A (HIGGINS et al.) 08.10.85	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
25.06.97

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1