



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 320 619**

② Número de solicitud: 200802006

⑤ Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.05.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑱ Inventor/es: **Costa García, Agustín;
Fernández Abedul, María Teresa;
Castaño Álvarez, Mario;
Fernández La Villa, Ana y
Pozo Ayuso, Diego F.**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Microchips de electroforesis capilar de resina EPON SU-8 con detección electroquímica integrada.**

㉑ Resumen:

Microchips de electroforesis capilar de resina EPON SU-8 con detección electroquímica integrada, preferentemente amperométrica, totalmente integrada en el microchip. La detección electroquímica se obtiene tanto con electrodos convencionales como con uno o varios microelectrodos en disposición array o interdigitados que permiten adaptar la detección al tipo de análisis que se requieran. También es objeto de la presente invención una metodología para la inyección de la muestra de forma simultánea y reproducible en dichos microchips. Además, es objeto de la presente invención el uso de dicho microchip para la separación, detección, identificación y cuantificación de varios compuestos químicos y bioquímicos. De aplicación en los sectores de análisis clínico, medioambiental o agroalimentario.

ES 2 320 619 A1

DESCRIPCIÓN

Microchips de electroforesis capilar de resina EPON SU-8 con detección electroquímica integrada.

5 Es objeto de la presente invención un microchip de electroforesis capilar de resina EPON SU-8 (desde ahora simplemente SU-8) que integra un sistema de detección electroquímico, preferentemente amperométrico; también es objeto de la presente invención una metodología para la inyección de la muestra de forma simultánea y reproducible en dichos microchips. Además, es objeto de la presente invención el uso de dicho microchip para la separación, detección, identificación y cuantificación de varios compuestos químicos y bioquímicos.

10 La invención resulta de aplicación en la separación, detección, identificación y cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas principalmente en los sectores de análisis clínico, medioambiental o agroalimentario.

Estado de la técnica

15 La detección electroquímica (ED) resulta una herramienta muy adecuada por su facilidad de miniaturización e integración, alta sensibilidad, selectividad, sencillez y bajo coste (J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VHC, New York, 2006).

20 Por otra parte, una de las tendencias actuales en gran variedad de campos de la ciencia es la miniaturización de los sistemas analíticos y bioanalíticos, lo cual ha dado lugar a la aparición de los llamados Lab-on-a-Chip (LOC) o microsistemas de análisis total (μ TAS) (P.S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887).

25 Así, los sistemas de análisis total (μ TAS), especialmente microchips de electroforesis capilar (MCE), se han beneficiado de las ventajosas características de la detección electroquímica desde que ésta fue introducida en los microchips de electroforesis capilar (P.F. Gavin, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 1997, 69, 3838; A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 1998, 70, 684). A diferencia de los métodos ópticos, como la fluorescencia (LIF), los sistemas electroquímicos son fácilmente miniaturizables y no requieren complicados componentes ópticos, haciendo el sistema mucho más portable.

30 El diseño de la celda electroquímica es uno de los puntos clave para el correcto funcionamiento de los microchip de electroforesis capilar con el sistema de detección. Así, se han descrito diferentes configuraciones para la integración y aislamiento del sistema de detección electroquímico en los microchips: dentro del canal, fuera del canal y a la salida del canal (W.R. Vandaveer IV, S.A. Pasas-Farmer, D.J. Fischer, C.N. Frankenfeld, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 2004, 25, 3528).

35 En las configuraciones dentro y fuera del canal, el electrodo de trabajo se encuentra situado dentro del canal de separación sin o con un desacoplador, respectivamente. En estos casos, los electrodos se basan en películas metálicas (oro, platino, paladio u óxido de indio y estaño - ITO) o de carbono, integradas en microchips generalmente de vidrio y polímero tal como el polidimetilsiloxano (PDMS) (R.S. Martin, K.L. Ratzlaff, B.H. Huyng, S.M. Lunte, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1136; M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 303; N.A. Lacher, S.M. Lunte, R.S. Martin, *Anal. Chem.* 2004, 76, 2482; J. Vickers, C.S. Henry, *Electrophoresis* 2005, 26, 4641; C. Chen, J.H. Hahn, *Anal. Chem.* 2007, 79, 7182; L.C. Meeker, R.S. Martin, *Electrophoresis* 2006, 27, 5032; A. Dawoud, T. Kawaguchi, R. Jankowiak, *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 245).

40 La configuración a la salida del canal, en la cual el electrodo de trabajo se encuentra situado a unas pocas micras de la salida del canal de separación, ha sido la más empleada. Este tipo de configuración ha permitido alinear externamente diferentes tipos de electrodos como hilos o discos metálicos, fibras de carbono o películas de carbono empleando complicados sistemas de auto-posicionamiento (US 2007/0039822 A1; US 6.878.255 B1; J. Wang, B. Tian, E. Sahlin, *Anal. Chem.* 1999, 71, 5436; M.A. Schwarz, B. Galliker, K. Fluri, T. Kappes, P.C. Hauser, *Analyst* 2001, 126, 147; J.C. Fanguy, C.S. Henry, *Electrophoresis* 2002, 23, 767; N. Bao, J.-J. Xu, Y.-H. Dou, Y. Cai, H.-Y. Chen, X.-H. Xia, *J. Chromatogr. A* 2004, 1041, 245; M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa García, *Electrophoresis* 2007, 28, 4679). Sin embargo, este tipo de electrodos no se encuentran totalmente integrados en el microchip y, por tanto, no aprovechan todas las ventajas de la inherente miniaturización de los sistemas de detección electroquímicos, requiriendo el empleo de elementos externos al propio microchip. Además, en muchos casos, el posicionamiento de los electrodos es irreproducible de modo que los resultados cambian de microchip a microchip. Así, también se ha empezado a integrar los electrodos en el microchip por medio de películas metálicas empleando técnicas de microfabricación, principalmente sobre sustratos de vidrio (PCT WO02/024322 A3; PCT WO03/06651 A2; US 5.906.723; US 6.045.676; R.P. Baldwin, T.J. Roussel, Jr., M.M. Crain, V. Bathlagunda, D.J. Jackson, J. Gullapalli, J.A. Conklin, R. Pai, J.F. Naber, K.M. Walsh, R.S. Keynton, *Anal. Chem.* 2002, 74, 3690; R. Wilke, S. Büttgenbach, *Biosens. Bioelectron.* 2003, 19, 149; A.A. Dawoud, T. Kawaguchi, Y. Markushin, M.D. Porter, R. Jankowiak, *Sens. Actuat. B* 2006, 120, 42 - 50).

65 Las técnicas de microfabricación también han permitido desarrollar diferentes detectores duales en los cuales se emplean dos electrodos de trabajo en serie (D.J. Fischer, W.R. Vandaveer IV, R.J. Grigsby, S.M. Lunte, *Electroanalysis* 2005, 17, 1153; R.S. Martin, A.J. Gawron, B.A. Fogarty, F.B. Regan, E. Dempsy, S.M. Lunte, *Analyst* 2001, 126, 277; R.S. Martin, A.J. Gawron, S.M. Lunte, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3196; A.J. Gawron, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 2001, 22, 242). La posibilidad de integrar un electrodo en el interior del canal de separación y

alinear externamente otro electrodo para obtener un sistema dual híbrido dentro/fuera del canal también ha sido evaluado (M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 291). También se han desarrollado microchips de vidrio con dos canales de separación paralelos en el que se emplean dos electrodos de trabajo en paralelo alineados externamente y que no se encuentran totalmente integrados en el propio microchip (D.F. Pozo Ayuso, M. Castaño-Álvarez, A. Fernández-la-Villa, M. García Granda, M.T. Fernández-Abedul, J. Rodríguez García, A. Costa-García, *J. Chromatogr. A* 2008, 1180, 193). Además, en estos casos se emplean electrodos de referencia y auxiliar externos que tampoco se encuentran integrados en el microchip. También se ha descrito un microchip de PDMS que consta de un canal de separación y otro canal de referencia paralelo, en los cuales se integra un electrodo de trabajo y referencia, respectivamente (C. Chen, J.H. Hahn, *Anal. Chem.* 2007, 79, 7182). La posibilidad de realizar ensayos paralelos también se ha evaluado empleando un microchip de policarbonato (PC) multicanal en combinación con un detector conductimétrico (H. Shadpour, M.L. Hupert, D. Patterson, C. Liu, M. Galloway, W. Stryjewski, J. Goettert, S.A. Soper, *Anal. Chem.* 2007, 79, 870).

La integración de la detección electroquímica se ha realizado principalmente en microchips fabricados en vidrio y materiales poliméricos como PMMA, PDMS o PC (A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, *Electrophoresis* 2005, 26, 4664; J. Wang, G. Chen, M. Pumera, *Electroanalysis* 2003, 15, 862; R.-H. Horng, P. Han, H.-Y. Chen, K.-W. Kuan-Wen Lin, T.-M. Tung-Mung Tsai, *J. Micromech. Microeng.* 2005, 15, 6; M. J. Schöning, M. Jacobs, A. Muck, D.-T. Knobbe, J. Wang, M. Chatrathi, S. Spillmann, *Sens. Actuat. B* 2005, 108, 688; J. Wang, M. Pumera, M. P. Chatrathi, A. Rodríguez, S. Spillman, R. S. Martin, S. M. Lunte, *Electroanalysis* 2002, 14, 1251; Y. Liu, D. Ganser, A. Schneider, R. Liu, P. Grodzinski, N. Kroutchinina, *Anal. Chem.* 2001, 73, 4196; M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, *Electrophoresis* 2005, 26, 3160).

La resina SU-8 es una foto-resina epoxi negativa que se caracteriza por su alta transparencia óptica, su facilidad para ser mecanizada, alta resistencia química y su carácter hidrofílico. Inicialmente este tipo de resina fue utilizada en procesos fotolitográficos como material perecedero para la fabricación de microchips y otros dispositivos en materiales de vidrio. Es decir, la resina SU-8 se empleaba como herramienta para construir dispositivos en otros materiales. Sin embargo, muy recientemente, este tipo de resina ha empezado a emplearse como material final en la fabricación de distintos dispositivos analíticos y bioanalíticos. (F.J. Blanco, M. Agirregabiria, J. García, J. Berganzo, M. Tijero, M.T. Arroyo, J.M. Ruano, I. Aramburu, K. Mayora, *J. Micromech. Microeng.* 2004, 14, 1047; S. Tuomikoski, S. Franssila, *Sens. Actuators A* 2005, 120, 408; T. Sikanen, S. Tuomikoski, R.A. Ketola, R. Kostieninen, S. Franssila, T. Kotiaho, *Lab Chip* 2005, 5, 888; C. Luo, A. Govindaraju, J. Garra, T. Schneider, R. White, J. Currie, M. Paranjape, *Sens. Actuat. A* 2004, 114, 123), incluyendo microchips de electroforesis capilar (M. Agirregabiria, F.J. Blanco, J. Berganzo, A. Fullaondo, A.M. Subyaga, K. Mayora, J.M. Ruano-López, *Electrophoresis* 2006, 27, 3627). Así, se ha desarrollado un proceso fotolitográfico de fabricación basado en el pegado de diversas capas de SU-8 (PCT WO 2007/080206 A1; M. Agirregabiria, F.J. Blanco, J. Berganzo, M.T. Arroyo, A. Fullaondo, K. Mayora, J.M. Ruano-López, *Lab Chip* 2005, 5, 545). Debido a que una de las características importantes de esta resina es la alta transparencia óptica, los microchips obtenidos han sido utilizados hasta el momento simplemente con detección óptica. Así, dada la novedad de este tipo de resina para la fabricación de estos dispositivos, la detección electroquímica no ha sido estudiada, ni por lo tanto empleada, en combinación con microchips de SU-8 hasta el momento. La combinación de las ventajosas características que presenta la resina SU-8 y la detección electroquímica puede dar lugar a dispositivos totalmente portátiles mucho más flexibles a los que existen actualmente. Sin embargo, actualmente los microchips de SU-8 deben ser adaptados adecuadamente, entre otras cosas, en cuanto a dimensiones de los canales, para poder incorporar un sistema de detección electroquímico. Así, los microchips empleados normalmente con la detección óptica no son compatibles con la detección electroquímica, dando lugar a un elevado ruido de la línea de base.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un microchip de electroforesis capilar en resina SU-8 en el que se integra un sistema de detección electroquímico, preferentemente amperométrico, que puede ser empleado en la determinación de un gran número de especies químicas y bioquímicas de interés clínico, medioambiental y agroalimentario entre otros. También se refiere a un método de inyección de muestras en dicho microchip y al uso de dicho microchip para la separación, detección, identificación y cuantificación de varios compuestos químicos y bioquímicos.

El microchip comprende uno o varios canales de separación y uno o varios canales de inyección. En el principio de cada canal de separación se sitúan los depósitos de la disolución reguladora. Al final de los canales de separación se encuentran los depósitos de la detección. Ambos canales se cruzan en una zona de intersección, situada más próxima a los depósitos de disolución reguladora que a los depósitos de detección, que delimita el volumen de muestra inyectada en el dispositivo. En al menos uno de los extremos de los canales de inyección se encuentran los depósitos de la muestra. Estos depósitos permiten la entrada y salida de las disoluciones en los distintos canales. En los depósitos de la detección se encuentra el sistema de detección electroquímico, el cual comprende un electrodo de trabajo por cada canal de separación y, comunes a todos los electrodos de trabajo, un electrodo de referencia y otro electrodo auxiliar. Además de estos electrodos, en cada depósito de disolución reguladora y en cada depósito de la muestra se encuentran los electrodos del voltaje de separación e inyección, respectivamente. En una realización preferida, el depósito de detección contiene además un electrodo de tierra adicional. Así, el voltaje de inyección es aplicado entre el electrodo de voltaje de inyección y los electrodos de detección o el electrodo de tierra. El voltaje de separación es aplicado entre el electrodo de voltaje de separación y los electrodos de detección o el electrodo de tierra. Estos voltajes permiten el movimiento de los fluidos en el interior de los canales de separación e inyección.

ES 2 320 619 A1

En una realización preferida el sistema de detección electroquímico es amperométrico.

5 En otra realización preferida, los electrodos del sistema de detección y de aplicación de los voltajes de separación e inyección son de metal, preferentemente de oro, platino, cobre, plata, níquel o paladio, o construidos con tintas líquidas, preferentemente de carbono, oro, platino o plata. En una realización más preferida los electrodos se integran mediante el empleo de técnicas fotolitográficas y/o de serigrafado. En una realización aún más preferida, para mejorar la fijación de las películas metálicas en el microchip de SU-8, se emplea una fina capa intermedia de titanio o cromo, preferiblemente de entre 5 y 50 nm.

10 En otra realización más específica los electrodos en forma de películas de capa fina ($<1 \mu\text{m}$ de espesor) o gruesa ($>1 \mu\text{m}$ de espesor) tienen un espesor entre 100 nm y $50 \mu\text{m}$ con una anchura comprendida entre 1 y $500 \mu\text{m}$.

15 En una realización más preferida el electrodo de trabajo se encuentra situado a una distancia entre 5 y $100 \mu\text{m}$ de la salida del canal de separación, lo cual permite aislar adecuadamente el sistema de detección del efecto del voltaje de separación sin pérdida de sensibilidad. A continuación se sitúan los electrodos de referencia y auxiliar en serie. En otra realización más específica la distancia electrodo-electrodo está determinada por una relación de distancias, anchura electrodo:espaciado entre electrodos, comprendida entre 1:0.25 y 1:20. Los electrodos incorporan además un contacto para la correspondiente conexión eléctrica con el sistema de medida y aplicación de los voltajes de inyección y separación.

20 En una realización más preferida la longitud de cada canal de separación está comprendida entre 10 y 100 mm, mientras que la longitud de los canales de inyección está entre 1 y 20 mm. Los depósitos de los canales tienen una distancia entre los bordes que los delimitan de 0.5 a 20 mm. En otra realización más preferida los canales tienen una anchura comprendida entre 10 y $150 \mu\text{m}$ y una profundidad entre 10 y $100 \mu\text{m}$.

25 Las dimensiones de los canales, así como la distancia a la que se encuentra el electrodo de trabajo a la salida del canal de separación, son muy importantes para el correcto funcionamiento del sistema de detección electroquímico. Así, si las dimensiones de los canales son superiores a las $150 \mu\text{m}$ de anchura y/o profundidad, la corriente generada en los canales al aplicar el voltaje de separación es demasiado elevada, lo cual influye sobre el sistema de detección produciendo un excesivo ruido en la línea de base. Por otra parte, si el electrodo de trabajo está muy próximo a la salida del canal de separación ($< 5 \mu\text{m}$) también se produce mucho ruido, mientras que si está muy lejos ($> 100 \mu\text{m}$) la sensibilidad del sistema disminuye.

30 En una realización más específica los electrodos de trabajo del sistema de detección son individuales o constituidos por una o varias series de microelectrodos en forma de array o en forma de dos series de microelectrodos interdigitados. En una realización aún más específica, en el sistema array, el electrodo de trabajo está formado por una serie de 2 a 100 microelectrodos. Todos los microelectrodos se unen en un extremo o en los dos extremos constituyendo una conexión eléctrica común. Así, los microelectrodos del array se encuentran unidos y funcionan al mismo potencial como si sólo hubiera un único electrodo de trabajo. Las corrientes faradáicas de cada uno de ellos se suman y minimizan las corrientes de origen capacitivo con lo que se mejora la relación señal/ruido (S/N) en las medidas.

35 En otra realización aún más específica, en el sistema interdigitado, el electrodo de trabajo consta de dos series de 2 a 100 microelectrodos en forma de peines que se entrecruzan y a los que se aplican de forma alternada potenciales diferentes. En este caso, el electrodo de trabajo tiene dos conexiones eléctricas: una para cada serie de microelectrodos. Este sistema es empleado para la determinación de especies químicas que presentan procesos electroquímicos reversibles, es decir que se pueden oxidar y reducir, lo cual permite amplificar la señal analítica final. En una realización todavía más específica, los microelectrodos del array o interdigitado tienen un espesor entre 100 nm y $20 \mu\text{m}$ y una anchura entre 1 - $50 \mu\text{m}$.

40 En otra realización todavía más específica el sistema array o interdigitado se sitúa al final del canal de separación y varía su situación desde $50 \mu\text{m}$ en el interior del canal de separación hasta $100 \mu\text{m}$ a la salida del canal de separación, lo cual permite llegar ha obtener un sistema de detección híbrido dentro/fuera del canal. Las pequeñas dimisiones de los microelectrodos les permiten estar dentro de los canales de separación sin que el voltaje de separación influya sobre su funcionamiento. En una realización todavía más preferida, la distancia microelectrodo-microelectrodo también está determinada por una relación, anchura electrodo:espaciado entre electrodos, comprendida entre 1:1 y 1:20. El electrodo de referencia y auxiliar se encuentran a continuación de la serie de microelectrodos.

45 En una realización más preferida, el microchip de SU-8 tiene un sólo canal de separación con un depósito de disolución reguladora y un depósito de detección, un sólo canal de inyección con dos depósitos de muestra, e integra un sistema de detección electroquímico con un único electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar en serie contenidos en el depósito de detección; un electrodo de voltaje de separación contenido en el depósito de disolución reguladora; y unos electrodos de voltaje de inyección contenidos en los depósitos de muestra.

50 En otra realización más preferida, el microchip, denominado dual, tiene dos canales de separación con un depósito de disolución reguladora en un extremo de cada canal y un depósito de detección en el otro extremo de cada canal. Además tiene un sólo canal de inyección con un depósito de muestra en cada extremo. El sistema de detección electroquímico integrado, tiene dos electrodos de trabajo en paralelo, además de un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar en serie, contenidos en los depósitos de detección. El microchip también dispone de un electrodo de voltaje de

ES 2 320 619 A1

separación contenido en el depósito de disolución reguladora; y unos electrodos de voltaje de inyección contenidos en los depósitos de muestra. En este diseño se emplea un sistema de cuatro electrodos de detección en forma de película de capa fina o gruesa: dos electrodos de trabajo en paralelo, uno para cada canal de separación, así como un electrodo de referencia y otro auxiliar en serie comunes a los dos electrodos de trabajo. En una realización aún más preferida, los canales de separación son paralelos y se encuentran separados a una distancia comprendida entre 0.25 y 5 mm.

En una realización más preferida, el microchip, denominado multicanal, tiene n (siendo $n \geq 3$) canales de separación con n depósitos de disolución reguladora y un único depósito de detección común. También tiene n canales de inyección, uno por cada canal de separación, con n depósitos de muestra. El microchip multicanal integra un sistema de detección amperométrico basado en n electrodos de trabajo, tantos como canales de separación, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, comunes a todos los electrodos de trabajo, todos ellos situados en el depósito de la detección. El microchip también dispone de un electrodo de voltaje de separación común a los n canales de separación contenido en los depósitos de disolución reguladora y n electrodos de voltaje de inyección contenidos en los n depósitos de muestra.

En el diseño dual se debe considerar un procedimiento para la introducción de la muestra simultáneamente y de manera reproducible en ambos canales de separación. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el método para la introducción de la muestra en los microchips duales que comprende las siguientes fases:

- a) Estabilización de la línea de base. Una vez rellenados los canales y depósitos con la disolución reguladora, se aplica un voltaje de separación entre 100 y 2000 V en el electrodo de voltaje de separación situado en el depósito de la disolución reguladora mientras el depósito de la detección se mantiene conectado a tierra. Simultáneamente se aplica un potencial de detección entre -0.5 V y +1.5 V en los electrodos de trabajo y se registran los correspondientes electroferogramas con el tiempo hasta que las líneas de base se estabilizan.
- b) Los depósitos de la muestra se rellenan con la muestra que contiene los compuestos a separar.
- c) El electrodo de voltaje de separación se mantiene conectado a la fuente de alto voltaje, pero sin aplicar ningún voltaje.
- d) Inyección de los analitos, para lo cual se aplica simultáneamente un voltaje de inyección entre 100 y 2000 V en los electrodos de voltaje de inyección situados en los dos depósitos de muestra, manteniendo el depósito de la detección conectado a tierra.
- e) Finalmente, se procede a la separación y detección de los analitos, para lo cual se vuelve a aplicar un voltaje de separación entre 100 y 2000 V en el electrodo de voltaje de separación contenido en el depósito de la disolución reguladora, manteniendo el depósito de la detección conectado a tierra. Al mismo tiempo se aplica un potencial de detección entre -0.5 V y +1.5 V en los dos electrodos de trabajo y se registra simultáneamente los dos electroferogramas, uno por cada canal de separación, con el tiempo.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del microchip para la detección de neurotransmisores, compuestos fenólicos, aminas, nitrocompuestos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, iones y complejos metálicos.

Las técnicas de microfabricación empleadas en los microchips de SU-8 permiten una producción de los microchips en grandes cantidades de forma muy reproducible. Estas técnicas también pueden ser empleadas para la producción de electrodos tanto para la detección como para la aplicación de los voltajes de separación e inyección, lo cual disminuiría el tiempo del proceso de fabricación de los dispositivos. Dada la facilidad y rapidez de fabricación de los microchips de SU-8 y el sistema de detección electroquímico, el sistema resultante puede ser incluso empleado como un dispositivo desechable, a diferencia de lo que ocurre actualmente con los dispositivos fabricados en sustratos de vidrio. Los microchips multicanal, al incluir varios canales con varios electrodos de trabajo, pueden funcionar al mismo potencial de detección de modo que en todos los canales se detectan las mismas sustancias. Sin embargo, también pueden funcionar a diferentes potenciales de detección lo cual permite detectar distintos analitos en cada canal de separación, pudiendo incrementar el número de determinaciones así como la selectividad en un análisis. Esto, por lo tanto, permite acortar en gran medida el tiempo de cada análisis lo cual es de gran importancia en campos como el clínico en el que se realizan un enorme número de análisis diarios.

La metodología para la introducción de las muestras en los microchips duales, que constan de dos canales de separación pero un solo canal de inyección, permite introducir de forma simultánea y reproducible la muestra en ambos canales de separación. Además esta metodología permite introducir muestras diferentes de forma independiente pero simultánea en cada uno de los canales de separación sin que se produzca contaminación cruzada.

El empleo de un sistema de detección electroquímico integrado en los microchips en el que el electrodo de trabajo está constituido por una o varias series de microelectrodos en disposición array o interdigitado, permite disminuir la corriente capacitiva favoreciendo la medida de la corriente faradámica debida a la oxidación y/o reducción de los analitos, lo cual mejora la relación señal-ruido consiguiendo una mayor sensibilidad y una disminución de los límites de detección. Además, debido al pequeño tamaño de los microelectrodos, estos se pueden situar en el interior del canal de separación sin incrementar la influencia del voltaje de separación lo cual también favorece la mejora de la sensibilidad con respecto a otros dispositivos descritos hasta el momento.

En este sistema tanto los electrodos de trabajo o serie de microelectrodos de trabajo, los electrodos de referencia y auxiliar, así como los electrodos del voltaje de separación e inyección, están totalmente integrados en el microchip de SU-8 a diferencia de lo que ocurre con otros dispositivos descritos. De este modo se obtiene un dispositivo que no requiere de una instrumentación externa para la colocación de los electrodos. Además la posibilidad de usar las mismas técnicas para la fabricación del microchip y los electrodos supone acortar el tiempo de producción. Esto permite realizar una producción masiva de los dispositivos de forma muy reproducible.

Estos dispositivos, totalmente miniaturizados y fácilmente portables, son de utilidad para el análisis, la separación, detección, identificación y cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas, como por ejemplo neurotransmisores, compuestos fenólicos, aminas, nitrocompuestos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, iones o complejos metálicos, siendo de gran interés en el sector clínico, medioambiental y agroalimentario, entre otros.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el esquema de un microchip de un solo canal de separación (1) y un canal de inyección (2) que se cruzan en una zona de intersección (7) y que incluye los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C), con un sistema integrado de detección electroquímico situado a la salida (3) del canal de separación compuesto por un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) además de los electrodos del voltaje de separación (5) e inyección (6) con los correspondientes contactos eléctricos (4).

La Fig. 2 muestra el esquema de un microchip de un solo canal de separación (1) y un canal de inyección (2) que se cruzan en una zona de intersección (7) y que incluye los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C) con un sistema integrado de detección electroquímico situado a la salida (3) del canal de separación compuesto por un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) además de los electrodos del voltaje de separación (5) e inyección (6) así como un electrodo de tierra (8) adicional.

La Fig. 3 muestra el esquema de un microchip con dos canales de separación (1), un canal de inyección (2) que se cruzan en una zona de intersección (7) y que incluye los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C) con un sistema integrado de detección electroquímico situado al final del canal de separación compuesto por dos electrodos de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE), además de los electrodos del voltaje de separación (5) e inyección (6) con los correspondientes contactos eléctricos (4).

La Fig. 4 muestra el esquema de un microchip con cuatro canales de separación (1), cuatro canales de inyección (2) y que incluye los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C) con un sistema de detección electroquímico situado al final del canal de separación compuesto por cuatro electrodos de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE), además de los electrodos del voltaje de separación (5) e inyección (6) con los correspondientes contactos eléctricos (4).

La Fig. 5 representa una parte de un microchip que contiene un sistema de detección electroquímico compuesto por un array de microelectrodos (9) como electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) situados en el depósito de la detección (B) al final (3) del canal de separación (1).

La Fig. 6 representa una parte de un microchip que contiene un sistema de detección electroquímico basado en un sistema interdigitado de microelectrodos (10) como electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) situados en el depósito de la detección (B) al final (3) del canal de separación (1).

La Fig. 7 muestra el electroferograma de intensidad (I), medida en nanoamperios (nA), vs. tiempo de migración (t_m), medido en segundos (s), para la separación y detección de los neurotransmisores dopamina (DA) y epinefrina (EP) en un microchip de SU-8 de un solo canal de separación con el sistema de detección electroquímico integrado.

La Fig. 8 muestra el electroferograma de intensidad (I), medida en nanoamperios (nA), vs. tiempo de migración (t_m), medido en segundos (s), para la separación y detección de los fenoles dopamina (DA), *p*-aminofenol (*p*AP) e hidroquinona (HQ) en un microchip de SU-8 de un solo canal de separación con el sistema de detección electroquímico integrado.

La Fig. 9 muestra los electroferogramas de intensidad (I), medida en nanoamperios (nA), vs. tiempo de migración (t_m), medido en segundos (s), para la separación simultánea y detección de los neurotransmisores dopamina (DA) y epinefrina (EP) en el primer (C-1) y segundo (C-2) canal de separación de un microchip de SU-8 dual con el sistema de detección electroquímico integrado.

Explicación de una forma de realización preferente

Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos de realización preferente, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Se ha empleado un sistema de detección basado en tres electrodos de platino integrado en los microchips de SU-8 de un solo canal como el que se muestra en la Fig. 1. El microchip constaba de un canal de inyección (2) de 10 mm de longitud y un canal de separación (1) de 35 mm de longitud. En el extremo de cada uno de los canales se encontraban los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C) de 2 mm de diámetro. Los canales tenían una geometría rectangular con una anchura de $50\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $20\ \mu\text{m}$. Se evaluaron dos diseños diferentes de los electrodos para la detección. El primero de ellos estaba formado por tres láminas de platino de 150 nm de espesor con una anchura de $100\ \mu\text{m}$ cada uno. Para mejorar la fijación de los electrodos en el microchip se empleó una capa de titanio de 15 nm. El electrodo de trabajo (WE) estaba situado a $20\ \mu\text{m}$ de la salida (3) del canal de separación (1), a $100\ \mu\text{m}$ de éste se encontraba el electrodo de referencia (RE) y a otras $100\ \mu\text{m}$ estaba el electrodo auxiliar (AE). En el segundo diseño la distancia entre los electrodos era la misma que en el primero y sólo cambiaba la anchura de las láminas de platino. Así, el electrodo de trabajo (WE) tenía una anchura de $50\ \mu\text{m}$, mientras los electrodos de referencia (RE) y auxiliar (AE) tenían una anchura de $250\ \mu\text{m}$.

Los canales del microchip de SU-8 fueron acondicionados con la disolución reguladora durante 10 min. En este caso la disolución reguladora empleada fue MES-His 25 mM, pH = 5.7. Una vez acondicionado, los canales se dejaron rellenos con la disolución reguladora y se procedió a aplicar el voltaje de la separación al electrodo de voltaje de separación (5) situado en el depósito de la disolución reguladora (A) con el depósito de la detección (B) conectado a tierra. Al mismo tiempo también se aplicó el potencial de detección adecuado en el electrodo de trabajo (WE) para estabilizar la línea de base del detector. Una vez estabilizada, se introdujo la muestra con los analitos a separar en uno de los depósitos de la muestra (C) y se procedió a su inyección. Para ello, se aplicó el voltaje de inyección al electrodo de voltaje de inyección situado en el depósito de la muestra (C), con el depósito de la detección (B) conectado a tierra. Una vez inyectada la muestra se procedió a su separación, volviendo a aplicar el voltaje de separación en el depósito de la disolución reguladora (A), y a la detección de los analitos.

El microchip de SU-8 con el primer diseño del detector electroquímico ha sido empleado para la optimización de los diferentes parámetros de la separación y detección de los neurotransmisores dopamina (DA) y epinefrina (EP).

El potencial de detección ha sido estudiado entre 0 y +1.4 V, obteniéndose un potencial óptimo de +1.2 V, en el cual se consigue la mejor relación señal/ruido (S/N) para la determinación de la DA y EP. El voltaje de separación ha sido estudiado entre +250 y +1500 V. Los mejores resultados en cuanto a resolución y eficacia se han obtenido empleando un voltaje de separación de +750 V.

En las condiciones óptimas, un voltaje de separación de +750 V, un voltaje de inyección de +250 V aplicado durante 5 s, un potencial de detección de +1.2 V y MES-His 25 mM pH = 5.7 como disolución reguladora, se ha conseguido una buena separación de la DA y EP como se muestra en la Fig. 7. En estas condiciones el sistema ha mostrado una buena relación lineal en el intervalo 0.5 - 200 μM con un coeficiente de correlación de 0.999 y 0.995 (n = 8) para la DA y EP, respectivamente. Las curvas de calibrado presentaron una sensibilidad de 65 y 73 pA/ μM para la DA y EP respectivamente. El límite de detección calculado, considerando una relación señal/ruido de 3 (S/N = 3), fue de 450 nM ($4.5 \cdot 10^{-7}\ \text{M}$) para ambos analitos.

La precisión de las señales analíticas se ha evaluado mediante una serie de inyecciones consecutivas de una mezcla de DA (100 μM) y EP (100 μM). La desviación estándar relativa (DER) de la intensidad de pico para diez señales sucesivas fue de 1.8% ($i_{p(\text{media})} = 6.4\ \text{nA}$) y 1.2% ($i_{p(\text{media})} = 6.8\ \text{nA}$) para la DA y EP, respectivamente. La DER del tiempo de migración fue de 2.1% ($t_{m(\text{medio})} = 105.4\ \text{s}$) y 2.0% ($t_{m(\text{medio})} = 134.6$) para la DA y EP, respectivamente.

El segundo diseño del sistema de detección integrado en el microchip monocanal de SU-8 ha sido empleado en la separación y detección de diversos compuestos fenólicos como la dopamina (DA), *p*-aminofenol (*p*AP) e hidroquinona (HQ). La separación de estos tres analitos, como se muestra en la Fig. 8, se consiguió empleando un voltaje de separación de +750 V, un voltaje de inyección de +500 V aplicado durante 5 s, un potencial de detección de +1.2 V y MES-His 25 mM pH = 5.95 como disolución portadora. En estas condiciones y empleando la HQ como marcador neutro se determinó una velocidad electroosmótica de $(0.049 \pm 0.002)\ \text{cm/s}$ y una movilidad electroosmótica de $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}\ \text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ para los microchips de SU-8.

Ejemplo 2

El sistema de detección electroquímico dual se integró en los microchips de doble canal de SU-8 los cuales constaban de dos canales de separación (1) paralelos de 35 mm espaciados 5 mm y un canal de inyección (2) de 10 mm común a ambos canales como el que se muestra en la Fig. 3. En el extremo de cada uno de los canales se situaron los depósitos de la disolución reguladora (A), detección (B) y muestra (C) de 2 mm de diámetro. Los canales tenían una geometría rectangular con una anchura de $50\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $20\ \mu\text{m}$. El sistema de detección se integró justo a la salida de los canales de separación (1) en el depósito de la detección (B). Este constaba de cuatro láminas de platino de 150 nm de espesor con una anchura de $100\ \mu\text{m}$ cada uno. Para mejorar la fijación de los electrodos en el microchip se empleó una capa de titanio de 15 nm. Las dos láminas de Pt que actúan de electrodos de trabajo (WE) se situaron a $20\ \mu\text{m}$ de la salida del canal de separación (1) y a continuación se situaron el electrodo de referencia (RE) y auxiliar (AE) separados unos de los otros $100\ \mu\text{m}$. Para poder emplear este detector fue necesario utilizar un sistema bipotenciostático para la aplicación del potencial de detección en ambos electrodos de trabajo.

ES 2 320 619 A1

En los microchips de doble canal, la introducción de la muestra ha sido importante para poder llevar a cabo separaciones simultáneas en ambos canales. Así, se evaluaron cuatro formatos de inyección diferentes InyC1, InyC2, InyCB e InyACB. En la Tabla I se recoge el modo en el que se aplicó el voltaje de inyección en los distintos formatos. Se empleó un voltaje de separación de +750 V, un potencial de detección de +1.2 V (el mismo en ambos electrodos de trabajo), MES-His 25 mM pH = 5.7 como disolución reguladora y una mezcla de dopamina (DA - 100 μ m) y epinefrina (EP - 100 μ m) como muestra.

TABLA I

Inyección	Depósito			
	A	B	C	C
<i>InyC1</i>	No voltaje – electrodo sin conexión	Tierra	+250 V (muestra)	Tierra
<i>InyC2</i>	No voltaje – electrodo sin conexión	Tierra	Tierra	+250 V (muestra)
<i>InyCB</i>	No voltaje – electrodo sin conexión	Tierra	+250 V (muestra)	+250 V (muestra)
<i>InyACB</i>	No voltaje – electrodo conectado	Tierra	+250 V (muestra)	+250 V (muestra)

En el primer tipo de inyección (*InyC1*), la muestra se situó en uno de los depósitos de la muestra (C) y se aplicó un voltaje de +250 V en el electrodo de voltaje de inyección (6) de este depósito (C), con el otro depósito de la muestra (C) y el depósito de la detección (B) conectados a tierra. En el depósito de la disolución reguladora (A) no se aplicó ningún voltaje y el electrodo no se conectó a la fuente de alto voltaje. El tiempo de inyección fue también evaluado entre 1 y 10 s. En todos los casos solo se observó una señal en el canal de separación (1) que se encontraba más cerca del depósito con la muestra (C). Cuando el tiempo de inyección se incrementó por encima de 10 s se empezó a observar una pequeña señal en el otro canal de separación (1), mientras se producía un ensanchamiento de la señal en el primer canal de separación. A la vista de esto, parecía que con este tipo de inyección la muestra era introducida preferentemente en el canal que se encontraba más próximo al depósito que contiene la muestra (C). Para comprobar este hecho, la muestra fue situada en el otro depósito de muestra (C) (*InyC2*) y se aplicó el voltaje de inyección (+250 V) en este depósito, con el otro depósito de muestra (C) y el depósito de detección (B) conectados a tierra. Al igual que ocurría en el caso anterior, solo se observaba una señal en el canal que se encontraba más cercano al depósito con la muestra (C).

En el siguiente formato de inyección (*InyCB*), la muestra se situó en ambos depósitos de muestra (C). El voltaje de inyección (+250 V) se aplicó en los dos depósitos de muestra (C) simultáneamente, mientras el depósito de detección (B) era mantenido a tierra. Al igual que en las inyecciones anteriores, el electrodo de voltaje de separación (5) en el depósito de la disolución reguladora (A) no se conectó a la fuente de alto voltaje. Cuando se emplearon tiempos de inyección menores de 10 s, no se obtuvo ninguna señal en ambos canales de separación (1). Cuando se incrementaba el tiempo de inyección, se empezó a observar una pequeña señal en ambos canales.

Finalmente se evaluó un último formato de inyección (*InyACB*) para intentar mejorar estas señales. Así, la muestra se volvió a situar en ambos depósitos de la muestra (C). El voltaje de inyección se aplicó en ambos depósitos con el depósito de detección (B) conectado a tierra, sin embargo, a diferencia de los casos anteriores, el electrodo de voltaje de separación (5) del depósito de la disolución reguladora (A) se conectó a la fuente de alto voltaje pero sin aplicar ningún voltaje. En este caso se obtuvieron dos señales prácticamente idénticas en ambos canales, empleando tiempos de inyección menores de 10 s como se muestra en la Fig. 8. De este modo se consiguió una forma de inyección sencilla para introducir la muestra de forma reproducible en el microchip de doble canal. En este tipo de inyección, el electrodo de la fuente de alto voltaje situado en el depósito de la disolución reguladora (A) estaba actuando como una tierra, lo que permitió que durante la inyección se generase un campo eléctrico lo suficientemente grande como para introducir una mayor cantidad de muestra en ambos canales. De esta forma se puso de manifiesto cómo el simple hecho de conectar el electrodo de voltaje de separación (5) en el depósito de la disolución reguladora (A) (sin aplicar ningún voltaje) era de gran importancia para poder conseguir señales reproducibles.

Este formato de inyección (*InyACB*) permite introducir la muestra simultáneamente pero independientemente en cada canal de separación. Así, esto se puede emplear para el análisis simultáneo de muestras que contengan diferentes analitos o diferentes concentraciones, en una única determinación con un único sistema de detección.

Ejemplo 3

El número de muestras que pueden ser determinadas en un mismo análisis se puede incrementar empleando un microchip multicanal el cual consta de tres o más canales de separación. En un microchip que conste de cuatro canales de separación (1) y cuatro canales de inyección (2) como el que se muestra en la Fig. 4, se pueden realizar cuatro determinaciones simultáneas empleando un único sistema de detección integrado en el microchip. El sistema de detección está constituido por cuatro electrodos de trabajo (WE), uno para cada canal de separación, un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) comunes a estos. Para poder funcionar con este detector es necesario utilizar un sistema multipotenciostático para la aplicación del potencial de detección en todos los electrodos de trabajo (WE).

Así, en este microchip se analizan cuatro muestras idénticas, inyectadas independientemente pero simultáneamente en cada canal de separación (1), lo cual aumenta la precisión de las determinaciones. También se pueden emplear muestras de diferentes concentraciones de modo que en un mismo análisis se tiene un calibrado (en este caso cuatro puntos del calibrado).

Otra posibilidad que presenta este sistema es el análisis de muestras que contengan analitos, los cuales se detecten a diferentes potenciales. Así cada uno de los electrodos puede funcionar a diferente potencial permitiendo aumentar la selectividad del sistema.

Ejemplo 4

El análisis de muestras biológicas en general requiere un sistema de detección muy sensible con el fin de determinar cantidades muy pequeñas de un determinado analito, como es el caso de los neurotransmisores (dopamina, epinefrina). Aunque la detección amperométrica tiene una elevada sensibilidad, ésta es mejorada con el empleo de un diseño array (9) o interdigitado (10) de electrodos de trabajo (WE) como los mostrados en las Fig. 5 y 6 respectivamente. Así, en el caso de la determinación de neurotransmisores se puede incrementar la sensibilidad y bajar el límite de detección especificado en el ejemplo 1 entre uno y dos órdenes de magnitud (10^{-8} - 10^{-9} M).

El diseño array (9) está basado en un haz de microelectrodos. Debido a su pequeño tamaño, las corrientes capacitivas y el ruido de fondo son mínimos, mientras que la medida de las corrientes faradáicas debidas a la oxidación o reducción de los analitos a determinar se ve favorecida. Así, al final, la corriente faradáica de cada uno de los microelectrodos se suma amplificando la señal final con el mínimo ruido. Se mejora por lo tanto la relación señal-ruido, lo que aumenta la sensibilidad del sistema y disminuye los límites de detección. En este caso todos los microelectrodos que constituyen el array funcionan al mismo potencial de detección.

En el caso de los interdigitados (10) se sitúan dos peines de microelectrodos entrecruzados, de modo que los microelectrodos funcionan de forma alterna a diferente potencial. Este diseño permite amplificar la señal de aquellos analitos que presentan procesos electroquímicos reversibles de oxidación y reducción. Así, los analitos son oxidados (o reducidos) en el primer microelectrodo, y lo oxidado se reduce (u oxida) en el segundo microelectrodo, volviendo a oxidarse nuevamente en el tercer microelectrodo y así sucesivamente. Este proceso cíclico permite amplificar la señal incluso para muy bajas concentraciones del analito, lo cual repercute en la disminución de los límites de detección y en la mejora de la sensibilidad del método. Para poder operar con este diseño se requiere el empleo de un sistema bipotenciostático con el fin de aplicar diferentes potenciales a cada uno de los peines de microelectrodos.

REIVINDICACIONES

5 1. Microchip de electroforesis capilar de resina EPON SU-8 que comprende uno o varios canales de separación (1) en cuyos extremos opuestos se sitúa un depósito de disolución reguladora (A) y un depósito de detección (B), y uno o
10 varios canales de inyección (2) con al menos un depósito de muestra (C) en uno de sus extremos, los cuales se cruzan en una zona de intersección (7) situada en la mitad superior del microchip **caracterizado** porque integra un sistema de detección electroquímico en los depósitos de detección (B) con al menos un electrodo de trabajo (WE) por cada canal de separación (1), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE); un electrodo de voltaje de separación (5) contenido en los depósitos de disolución reguladora (A); y un electrodo de voltaje de inyección (6) contenido en cada depósito de muestra (C).

15 2. Microchip según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los electrodos son de metal o contruidos con tintas líquidas.

3. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el metal es oro, platino, cobre, plata, níquel o paladio.

20 4. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque las tintas son de carbono, de oro, de platino o de plata.

5. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los electrodos son integrados mediante técnicas fotolitográficas o de serigrafado.

25 6. Microchip según la reivindicación 3 **caracterizado** porque los electrodos metálicos incorporan una capa intermedia de cromo o titanio.

7. Microchip según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la capa intermedia de los electrodos tiene un espesor de entre 5 y 50 nm.

30 8. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque además comprende un electrodo de tierra (8) adicional contenido en los depósitos de detección (B).

9. Microchip según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el sistema de detección electroquímico es amperométrico.

35 10. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los canales de separación (1) tienen una longitud entre 10 y 100 mm, los canales de inyección (2) tienen una longitud entre 1 y 20 mm y los depósitos (A, B y C) tienen una distancia entre los bordes que lo delimitan de 0.5 a 20 mm.

40 11. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los canales tienen una anchura comprendida entre 10 y 150 μm y una profundidad entre 10 y 100 μm .

12. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque los electrodos tienen un espesor entre 100 nm y 50 μm y una anchura entre 1 y 500 μm .

45 13. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el electrodo de trabajo (WE) se sitúa a la salida (3) de los canales de separación (1) a una distancia entre 5 y 100 μm .

50 14. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el electrodo de trabajo (WE) se compone de un array de microelectrodos (9).

15. Microchip según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el array está formado por una serie de 2 a 100 microelectrodos.

55 16. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque el electrodo de trabajo (WE) se compone de dos series de microelectrodos interdigitados (10).

17. Microchip según la reivindicación 16 **caracterizado** porque el interdigitado está formado por dos series de 2 a 100 microelectrodos.

60 18. Microchip según la reivindicación 14 ó 16 **caracterizado** porque los microelectrodos tienen un espesor entre 100 nm y 20 μm y una anchura entre 1 y 50 μm .

65 19. Microchip según la reivindicación 14 **caracterizado** porque la situación del array de microelectrodos (9) al final del canal de separación (1) varía entre 50 μm dentro del canal de separación (1) y 100 μm fuera del canal de separación (1).

ES 2 320 619 A1

20. Microchip según la reivindicación 16 **caracterizado** porque la situación de los microelectrodos interdigitados (10) al final del canal de separación (1) varía entre $50\ \mu\text{m}$ dentro del canal de separación (1) y $100\ \mu\text{m}$ fuera del canal de separación (1).

5 21. Microchip según la reivindicación 13 ó 19 ó 20 **caracterizado** porque la separación entre los electrodos de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el electrodo auxiliar (AE) es una relación de distancias, anchura electrodo:espaciado entre electrodos, comprendida entre 1:0.25 y 1:20.

10 22. Microchip según la reivindicación 14 ó 16 **caracterizado** porque la separación entre los microelectrodos (9 ó 10) es una relación de distancias, anchura microelectrodo:espaciado entre microelectrodos, comprendida entre 1:1 y 1:20.

15 23. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque tiene un sólo canal de separación (1) con un depósito de disolución reguladora (A) y un depósito de detección (B), un sólo canal de inyección (2) con dos depósitos de muestra (C) y que integra un sistema de detección electroquímico con un único electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) en serie contenidos en el depósito de detección (B); un electrodo de voltaje de separación (5) contenido en el depósito de disolución reguladora (A); y unos electrodos de voltaje de inyección (6) contenidos en los depósitos de muestra (C).

20 24. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque tiene dos canales de separación (1) con dos depósitos de disolución reguladora (A) y dos depósitos de detección (B), un sólo canal de inyección (2) con dos depósitos de muestra (C) y que integra un sistema de detección electroquímico con dos electrodos de trabajo (WE) en paralelo, un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) en serie contenido en los depósitos de detección (B); un electrodo de voltaje de separación (5) contenido en el depósito de disolución reguladora (A); y unos electrodos de voltaje de inyección (6) contenidos en los depósitos de muestra (C).

25 25. Microchip según la reivindicación 24 **caracterizado** porque los canales de separación (1) son paralelos y se encuentran a una distancia comprendida entre 0.25 y 5 mm.

30 26. Microchip según la reivindicación 2 **caracterizado** porque tiene n ($n \geq 3$) canales de separación (1) con n depósitos de disolución reguladora (A) y un único depósito de detección (B) común; n canales de inyección (2) con n depósitos de muestra (C) y que integra un sistema de detección amperométrico basado en n electrodos de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE) y un electrodo auxiliar (AE) situados en el depósito de la detección (B); un electrodo de voltaje de separación (5) común a los n canales de separación contenido en los depósitos de disolución reguladora (A); y n electrodos de voltaje de inyección (6) contenidos en los n depósitos de muestra (C).

27. Método para la inyección simultánea de la muestra en los microchips de la reivindicación 25 que comprende:

40 a) la aplicación de un voltaje de separación comprendido entre 100 y 2000 V al electrodo de voltaje de separación (5) situado en el depósito de la disolución reguladora (A) manteniendo el depósito de la detección (B) conectado a tierra, y la aplicación de un potencial de detección entre -0.5 y +1.5 V a los dos electrodos de trabajo (WE) hasta estabilizar las líneas de base;

45 b) el llenado de los dos depósitos de muestra (C) con la muestra que contiene los compuestos a separar;

c) la conexión del electrodo de voltaje de separación (5) a la fuente de alto voltaje pero sin aplicar ningún voltaje;

50 d) la aplicación simultánea de un voltaje de inyección comprendido entre 100 y 2000 V a los electrodos de voltaje de inyección (6) situados en los dos depósitos de muestra (C), manteniendo el depósito de la detección (B) conectado a tierra;

55 e) la aplicación de un voltaje de separación comprendido entre 100 y 2000 V al electrodo de voltaje de separación (5) contenido en el depósito de la disolución reguladora (A), manteniendo el depósito de la detección (B) conectado a tierra, y la aplicación de un potencial de detección entre -0.5 y +1.5 V a los dos electrodos de trabajo (WE) para registrar los dos electroferogramas simultáneamente en ambos canales de separación (1).

60 28. Uso del microchip de la reivindicación 2 para la separación y detección de neurotransmisores, compuestos fenólicos, aminas, nitrocompuestos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, iones y complejos metálicos.

65

FIG. 1

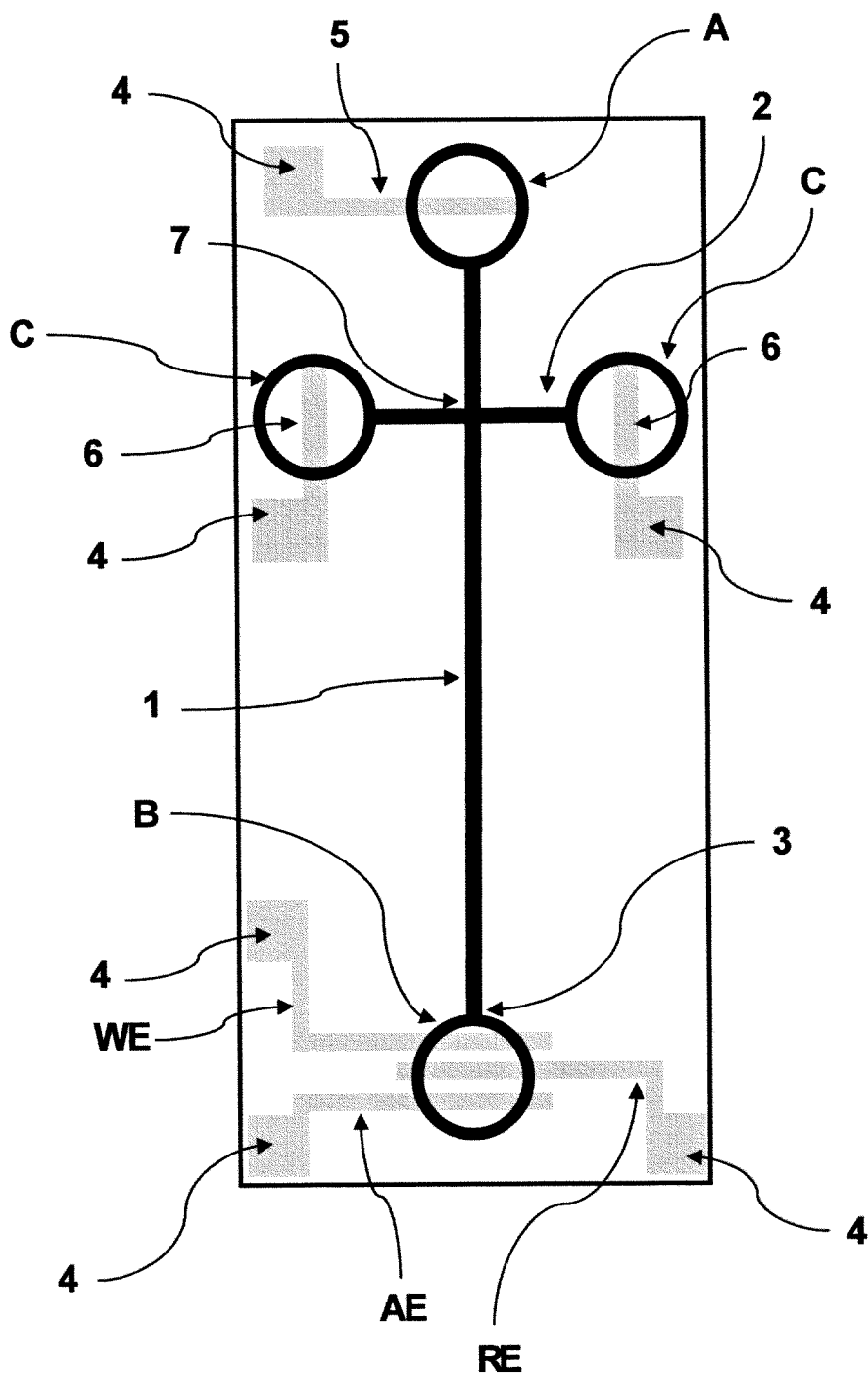


FIG. 2

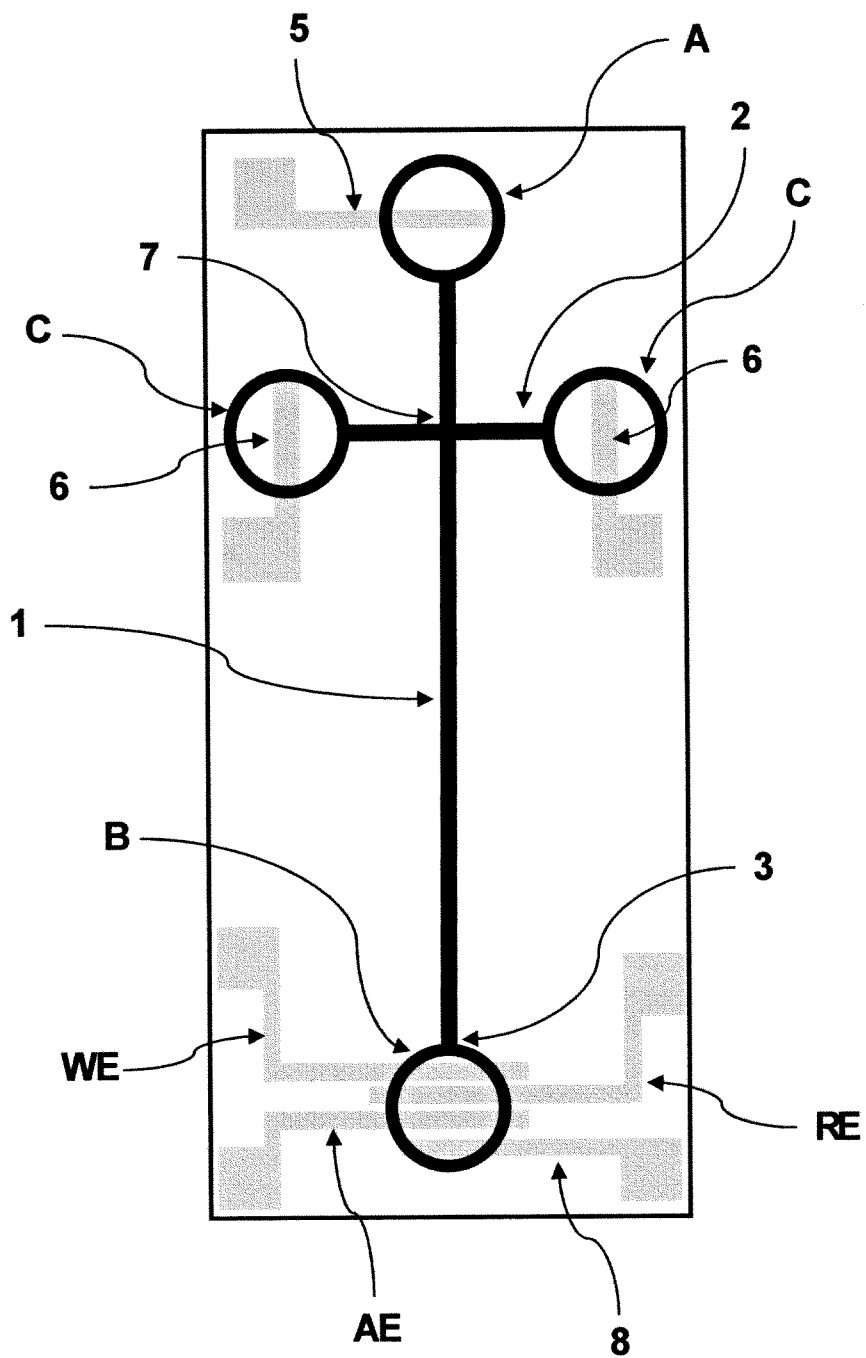


FIG. 3

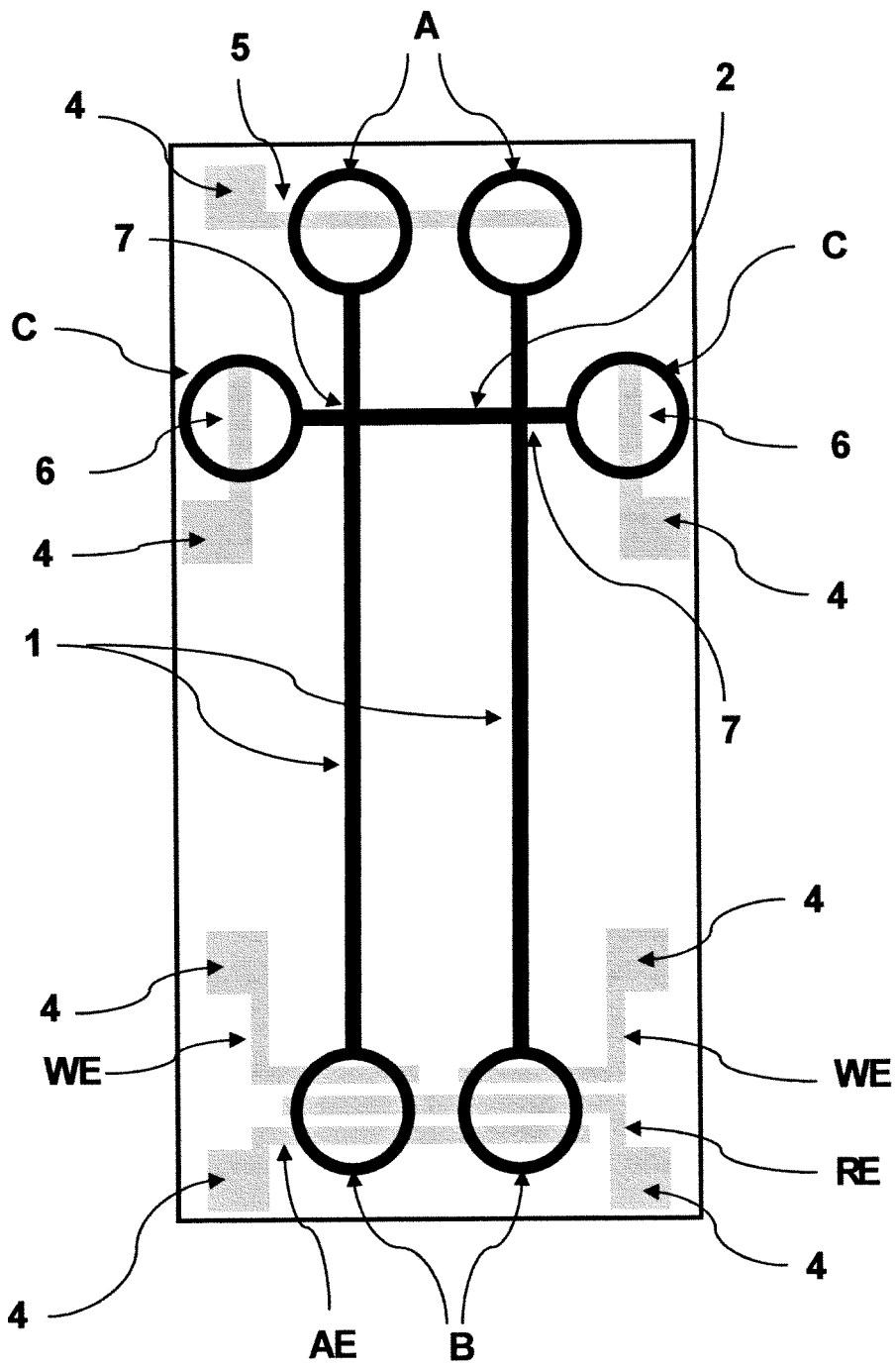


FIG. 4

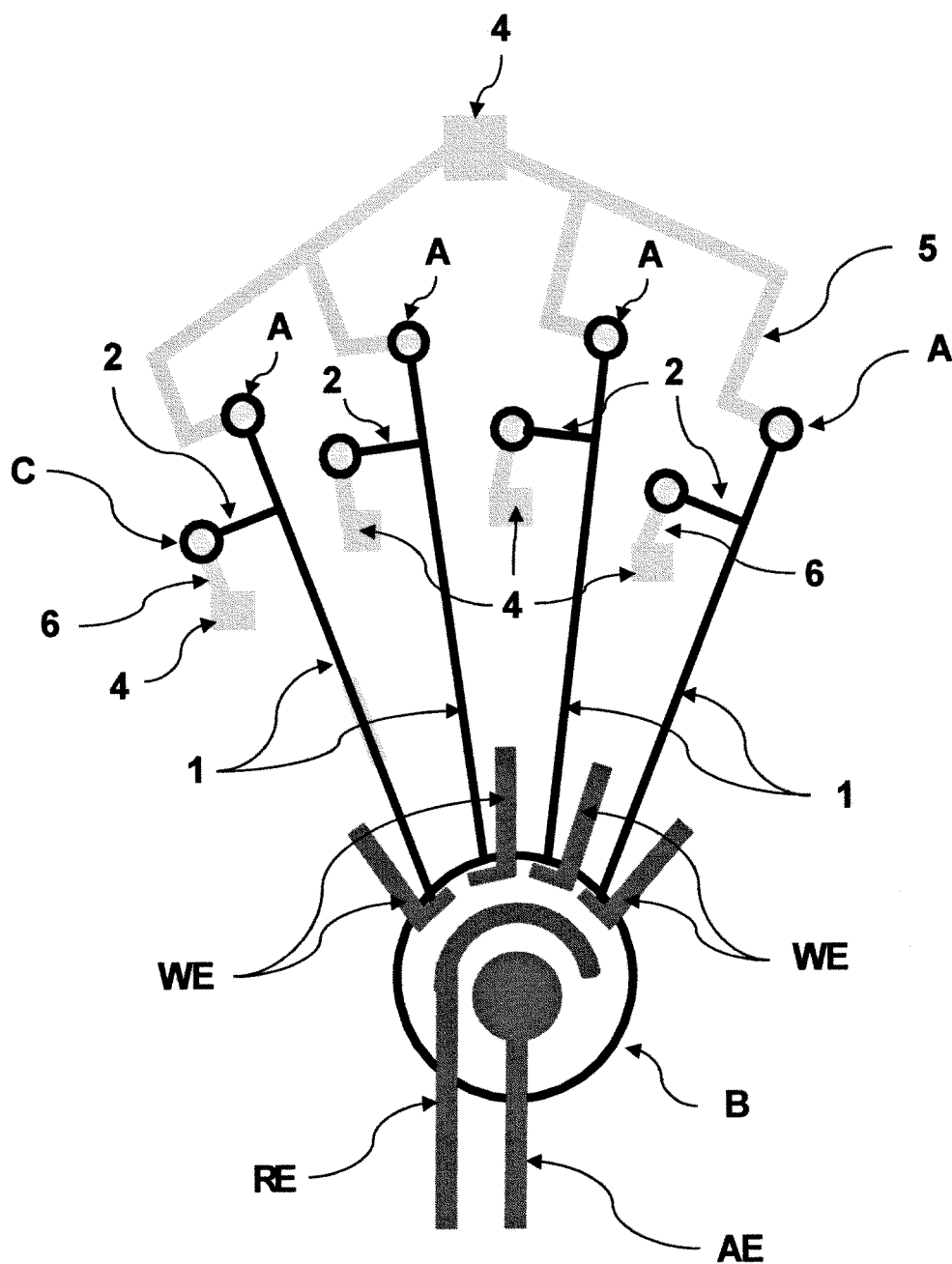


FIG. 5

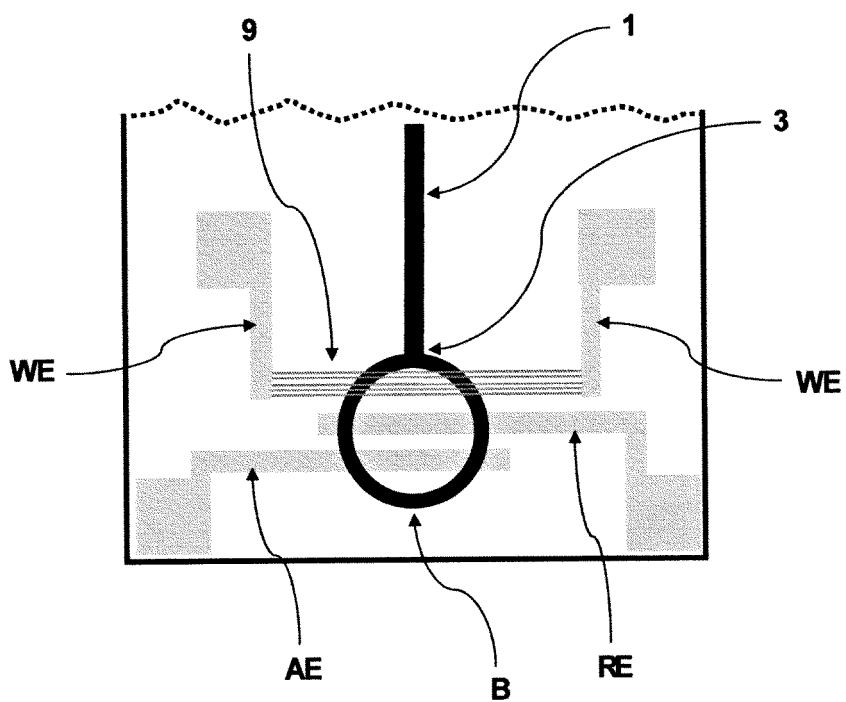


FIG. 6

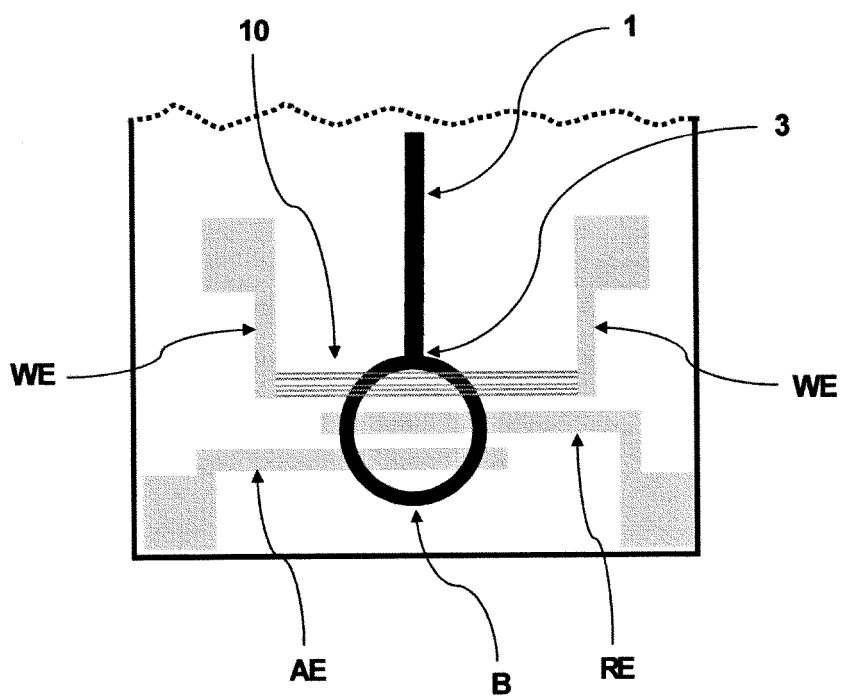


FIG. 7

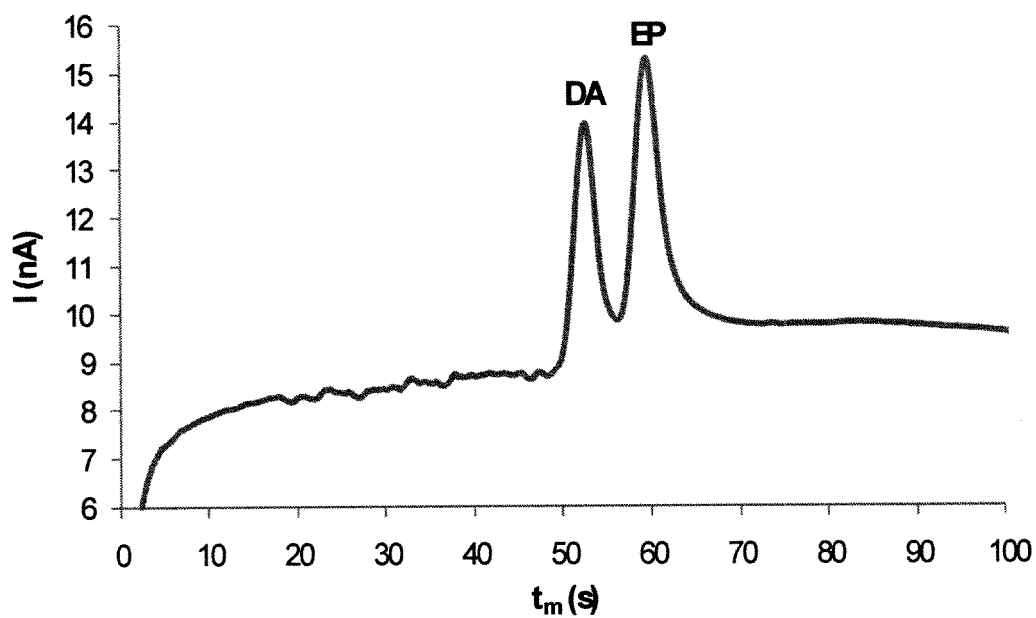


FIG. 8

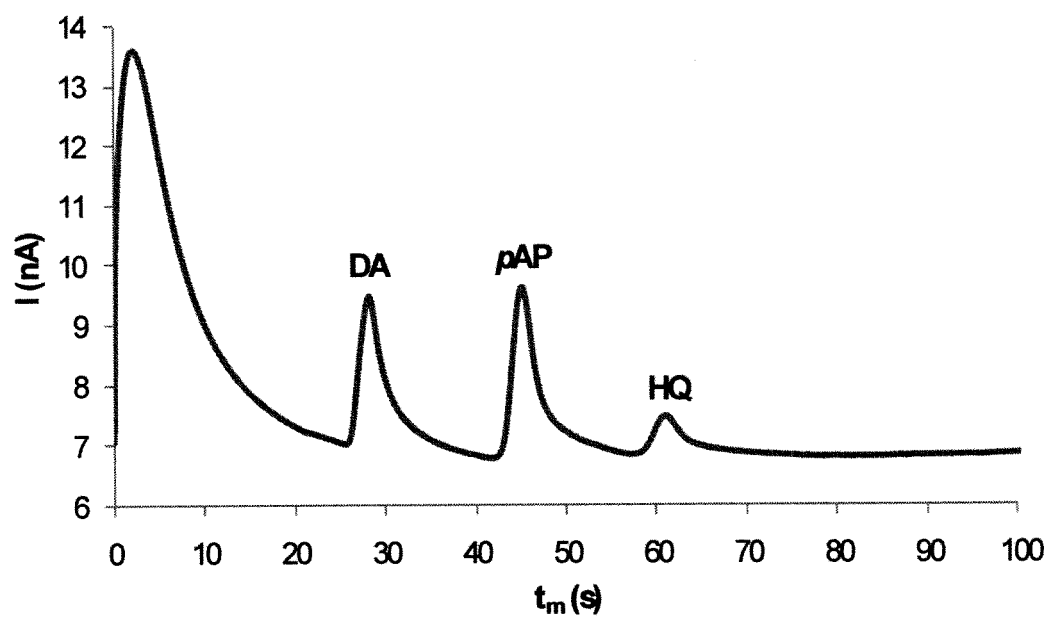
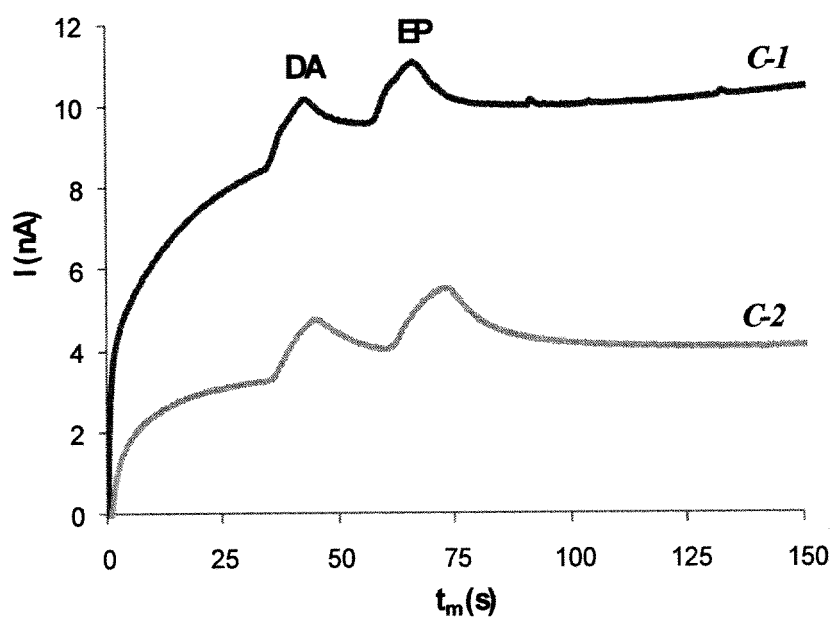


FIG. 9





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 320 619

② Nº de solicitud: 200802006

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.06.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 27/447** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	POZO-AYUSO et al. "Fabrication and evaluation of single and dual channel (?-design) microchip electrophoresis with electrochemical detection." Journal of Chromatography A, 03.01.2008, Vol. 1180, páginas 193-202.	1-5,8-13, 23-28
A		14-22
Y	BLOSCHOCK et al. "Development of a MEMS-fabricated SU-8 device for 2D separations" Smart Medical and Biomedical Sensor Technology IV. Edited by Cullum, Brian M.; Carter, J. Chance. Proceedings of the SPIE, (2006) Vol. 6380, pp. 638001.	1-5,8-13, 23-28
A	ARAVAMUDHAN et al. "Electrochemical biosensor for targeted detection in blood using aligned Au nanowires" Sensors and Actuators B, Vol. 127, 20.10.2007, páginas 29-35.	1-4,14-22
A	AGIRREGABIRIA et al. "SDS-CGE of proteins in microchannels made of SU-8 films" ELECTROPHORESIS. Vol. 27, Issue 18, Páginas 3627-3634. Special Issue: Microchannel-Based Methods for Proteomics. Publicación (On-line): 15.09.2006.	1-28
A	MARTIN et al. "Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly (dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips" Anal. Chem., 2000, 72 (14), 3196-3202. Fecha de publicación (on-line): 31.05.2000.	1-28
A	WOOLLEY et al. "Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection" Anal. Chem., 1998, 70 (4), páginas 684-688. Fecha de pub (on-line): 15.01.1998.	1-28

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 nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
11.05.2009	P. López Sabater	1/1