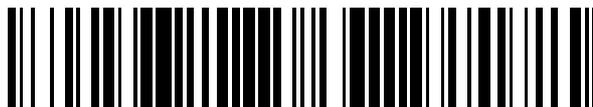


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 358 657**

21 Número de solicitud: 200930539

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2011**

Fecha de la concesión: **12.03.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.03.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.03.2012

73 Titular/es:

**FUNDACION CIDETEC
PARQUE TECNOLÓGICO DE MIRAMÓN
PASEO MIRAMÓN, 196
20009 SAN SEBASTIÁN, GIPUZKOA, ES**

72 Inventor/es:

**OCHOTECO VAQUERO, ESTÍBALIZ;
JUBETE DÍEZ, ELENA;
POMPOSO ALONSO, JOSÉ ADOLFO;
GRANDE TELLERÍA, HANS-JÜRGEN;
ISTAMBOULIE, GEORGES;
NOGUER, THIERRY y
MARTY, JEAN LOUIS**

74 Agente/Representante:

Carpintero López, Mario

54 Título: **SENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE ANALITOS EN MEDIOS LÍQUIDOS.**

57 Resumen:

Sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos.

La invención define un sensor electroquímico para detectar analitos en medios líquidos con estructura multicapa (Figura 1) que comprende, entre otras, una primera capa (1) que comprende un material carbonoso depositada sobre un sustrato, constituyendo dicha capa el sistema de electrodos del sensor electroquímico que está compuesto al menos por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo; y una cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo seleccionada entre (d1) y (d2), donde:

(d1) comprende una capa que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una capa que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre dicha capa de politiofeno; y

(d2) es una capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

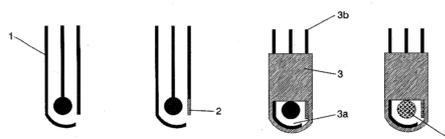


FIG. 1

ES 2 358 657 B1

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

DESCRIPCIÓN

Sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de los sensores electroquímicos para la detección de analitos en medios líquidos. En particular, la invención se refiere a sensores electroquímicos que incluyen electrodos sensores basados en materiales conductores de bajo coste (materiales carbonosos y politiofenos) los cuales, depositados sobre un soporte adecuado con una geometría óptima permiten, mediante técnicas electroquímicas, la detección de concentraciones mínimas de compuestos en medios líquidos. Así, el sensor electroquímico de la invención combina límites de detección mínimos a la vez que bajos costes de producción.

15 **Antecedentes de la invención**

El ámbito medioambiental, agroalimentario y médico-sanitario requieren herramientas de control y detección eficaces que, aplicadas a problemáticas concretas, permitan una mejora en la calidad de vida. Así, se hace cada vez más necesario en el campo del medio ambiente el control de pesticidas y tóxicos en aguas; y en el campo alimentario, el control de pesticidas o patógenos en los alimentos previamente a su introducción en el mercado, así como la detección rápida del deterioro de los alimentos. Igualmente, en el campo médico-sanitario es imprescindible identificar la presencia de organismos externos en el cuerpo humano y su concentración, así como el diagnóstico precoz de enfermedades.

Los métodos analíticos tradicionales se basan en cromatografía líquida, gaseosa o espectrometría de masas. En líneas generales, estos son métodos muy fiables, con altos grados de detección. Sin embargo, son métodos caros y excesivamente lentos. Además, se basan en la recolecta de muestras para un posterior análisis, por lo que no permiten un control en línea. Existe por ello la necesidad de disponer de herramientas analíticas que requieran una preparación de muestra mínima, que posibiliten una medida rápida, que sean portátiles y aplicables *in situ*, y que permitan actuar a tiempo frente a situaciones adversas.

Estas tecnologías deben cumplir dos requerimientos. En primer lugar, un alto grado de sensibilidad, siendo éste un factor limitante y, en segundo lugar, que estos grados de sensibilidad se obtengan en base a tecnologías de bajo coste, portátiles y a las que puedan acceder los múltiples usuarios.

La Unión Europea ha fijado un límite máximo de residuos pesticidas en alimentos que ronda los 0,1 microgramos por kilogramo de alimento. Así, las exigencias de control y detección derivadas de esta normativa son enormes. Se exige el desarrollo de nuevas herramientas de control y monitorización que permitan no sólo la detección de esas trazas de compuesto, sino una tecnología de detección que pueda ser empleada en cualquier momento y lugar. Esto es, que esté al alcance de agricultores, empresas agroalimentarias, expendedores de pesticidas, laboratorios o cualquier agente interesado en controlar la presencia de pesticidas en los vegetales y frutas frescas.

En cuanto al sector médico-sanitario, se requieren tecnologías de detección de organismos externos en el cuerpo humano y su concentración para el diagnóstico precoz de enfermedades. Cuanto mayor sea el grado de sensibilidad, antes se dispondrá del diagnóstico, permitiendo así un control y tratamiento adecuado. Las tecnologías de bajo coste favorecerán, a su vez, el uso regular en la consulta del médico, o incluso un diagnóstico personal o doméstico, evitando la necesidad de análisis caros y lentos en los laboratorios hospitalarios.

Se han descrito en el estado de la técnica diferentes sensores electroquímicos basados en la deposición de varias pistas de material sobre un sustrato aislante que puede ser plástico o cerámico. Las pistas pueden ser depositadas mediante serigrafía, litografía, deposición en estado vapor, esprayado, o técnicas de deposición similares. La primera capa consiste en un material conductor metálico que define la geometría de los electrodos (electrodo o electrodos de trabajo o sensores, electrodo de referencia y contraelectrodo). Esta primera capa de material conductor metálico suele ser típicamente de plata, si bien se han descrito otros posibles materiales metálicos tales como oro, platino, paladio, cobre o tungsteno (US 5,120,420, US 5,798,031, US 2005/0183953 A1, WO 2007/026152, US 2007/0080073). La segunda capa consiste habitualmente en un material conductor depositado sobre el electrodo de trabajo y sobre el contraelectrodo que puede ser metálico tal como una pasta a base de oro, plata, platino, paladio, cobre o tungsteno, por ejemplo; o no-metálico tal como una pasta fabricada en base a un material de carbono (grafito o negro de humo, por ejemplo) (US 5,120,420, US 5,798,031, US 2005/0183953 A1, WO 2007/026152, US 2007/0080073), o en base a un polímero conductor (WO 2007/026152). En algunos casos, existe una tercera capa que suele consistir en una pasta de Ag/AgCl, depositada únicamente sobre el electrodo de referencia (US 2005/0183953 A1). Asimismo, sobre el electrodo de trabajo se puede depositar una cuarta capa de material aislante, típicamente de material polimérico que puede ser un gel polimérico (celulosa, poli(alcohol vinílico), gelatina, Tween-20, Tritón X-100, Surfínol, etc.) para el atrapamiento físico de un compuesto biológico participante en la detección electroquímica (US 2005/0183953 A1). Este compuesto biológico es responsable de la especificidad y detección electroquímica y puede ser una enzima, proteínas, oligonucleótidos, polinucleótidos o vitaminas, por ejemplo (US 2005/0183953 A1, US 5,120,420, US 5,798,031, FR 2 798 145).

Esta última capa de material en el electrodo de trabajo puede incorporar un mediador. El mediador actúa aceptando electrones desde la enzima o donando electrones a la misma una vez que la reacción electroquímica ha ocurrido. Así, en algunos casos, el mediador puede actuar regenerando la enzima oxido-reductasa. Los mediadores descritos son complejos de metales de transición como los derivados de ferroceno o ferrocianuros (US 5,653,863), pero también pueden tratarse de benzoquinonas y naftoquinonas (US 4,746,607), compuestos nitrosos o hidroxilaminas (EP 0 354 441), flavinas, fenazinas, fenotiazinas, o indofenoles (EP 0 330 517).

No se ha descrito en el estado de la técnica la utilización de politiofenos como agentes mediadores en la fabricación de sensores electroquímicos, una familia de polímeros conductores intrínsecos de elevada estabilidad y procesables a partir de dispersiones acuosas. Las patentes US 4,959,430 y US 4,987,042 describen diferentes procedimientos de preparación de dispersiones basadas en poli(etilen-dioxi-tiofeno) y las patentes US 5,766,515 y US 5,370,981 su uso en forma de electrodo transparente en dispositivos electroluminiscentes y para preparar plásticos antiestáticos, respectivamente. Asimismo, en el documento FR 2 798 145 se describe el uso de politiofenos, entre muchos otros polímeros conductores electroquímicamente sintetizados, como soporte para el anclaje de sondas de reconocimiento específico, ya que contienen grupos funcionales en los que se enlazan dichas sondas. Por otro lado, en el documento WO 2007/026152 se describe el uso de politiofenos, entre otros polímeros conductores, como componente del electrodo sustituyendo al material de carbono en la segunda capa, pero no como mediador.

Igualmente, tampoco se han descrito sensores electroquímicos que prescindan de la primera capa de material conductor metálico, dando lugar a una tecnología de bajo coste.

Así pues, continúa existiendo en el estado de la técnica la necesidad de sensores electroquímicos alternativos de bajo coste, que no incorporen materiales costosos, y cuyo diseño posibilite la detección de analitos con una máxima sensibilidad.

El sensor electroquímico de la presente invención que usa politiofenos como mediadores y una primera capa a base de material carbonoso permite la detección de analitos en un medio líquido con un alto grado de sensibilidad y con menor coste, posibilitando el análisis de concentraciones mínimas de estos analitos en cualquier momento, en cualquier lugar y por parte de múltiples usuarios.

Objeto de la invención

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar dicho sensor electroquímico.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la vista superior del sensor electroquímico de la invención, en la que puede verse su estructura multicapa.

La figura 2 muestra una vista lateral del sensor electroquímico de la invención en el que la cuarta capa es la capa (d1), que comprende una primera capa (4a) que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una segunda capa (4b) que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre la capa de politiofeno.

La figura 3 muestra una vista lateral del sensor electroquímico de la invención en el que la cuarta capa es la capa (d2), que es una capa de gel polimérico conductor depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

La figura 4 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en función de la concentración del pesticida clorpirifós oxon determinada en un sensor electroquímico de la invención que comprende una primera capa de grafito y una cuarta capa que comprende, a su vez, una capa de PEDOT sobre la que se deposita una capa de PVA (capa (d1)).

La figura 5 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en función de la concentración del pesticida clorpirifós oxon determinada en un sensor electroquímico de la invención que comprende una primera capa de grafito y una cuarta capa de PEDOT y PVA (capa (d2)).

La figura 6 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en función de la concentración del pesticida clorpirifós oxon determinada en un sensor electroquímico de la invención que comprende una primera capa de grafito y una capa intermedia de cobalto ftalocianina sobre la que se deposita la cuarta capa de PEDOT y PVA (capa (d2)).

La figura 7 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en función de la concentración del pesticida clorpirifós oxon determinada en un sensor electroquímico de la invención que comprende una capa intermedia de plata depositada sobre el sustrato y sobre la que se deposita una primera capa de grafito y una cuarta capa que comprende, a su vez, una capa de PEDOT sobre la que se deposita una capa de PVA (capa (d1)).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos, en adelante “sensor electroquímico de la invención”, que comprende:

- (a) una primera capa (1) que comprende un material carbonoso depositada sobre un sustrato, constituyendo dicha capa el sistema de electrodos del sensor electroquímico que está compuesto al menos por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;
- (b) una segunda capa (2) que comprende un material metálico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia;
- (c) una tercera capa (3) que comprende un material aislante depositada sobre una parte del sistema de electrodos, siendo dicha parte la que queda entre la superficie de análisis (3a) y los contactos eléctricos (3b) del equipo de medida, de modo que quede expuesta únicamente la parte inferior de los electrodos del sistema de electrodos;
- (d) una cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo seleccionada entre (d1) y (d2), donde:
 - (d1) comprende una capa que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una capa que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre dicha capa de politiofeno; y
 - (d2) es una capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

Esta estructura multicapa del sensor electroquímico de la invención puede verse en la Figura 1, en la que se representa la geometría óptima del mismo, si bien podría presentar otras posibles geometrías.

En el contexto de la invención el término “electrodo de referencia” se refiere a un electrodo que tiene un potencial de equilibrio estable y conocido, y que se utiliza para medir el potencial contra otros electrodos en un sistema electroquímico.

Asimismo, en el contexto de la invención el término “electrodo de trabajo” se refiere al electrodo en el que, en un sistema electroquímico, se produce la reacción de interés. El electrodo de trabajo se usa a menudo en combinación con un contraelectrodo y un electrodo de referencia en un sistema de tres electrodos, si bien puede haber más de un electrodo de trabajo dando lugar a un sistema de electrodos o multielectrodo. Dependiendo de si la reacción en el electrodo es una reducción o una oxidación, el electrodo de trabajo se puede considerar un cátodo o un ánodo.

Igualmente, en el contexto de la invención el término “contraelectrodo” se refiere a un electrodo no polarizable que completa el circuito de la celda. En celdas de laboratorio, el contraelectrodo, por lo general, es un conductor inerte como el platino o grafito.

Así, en una realización particular, el sistema de electrodos del sensor electroquímico de la invención está compuesto por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. En otra realización particular, el sistema de electrodos del sensor electroquímico de la invención está compuesto por un electrodo de referencia, dos o más electrodos de trabajo y un contraelectrodo.

En el contexto de la invención, la expresión “detección de analitos en medios líquidos” se refiere tanto a la determinación cualitativa como a la determinación cuantitativa de un analito contenido en un medio líquido (disolución, dispersión, etc.) sometido a ensayo.

Dicha determinación se realiza bien por inmersión del sensor electroquímico de la invención en el medio líquido que contiene el analito, o bien por deposición de una gota de dicho medio líquido sobre la superficie de análisis (3a) del sensor electroquímico de la invención.

El sustrato puede ser cualquier sustrato apropiado conocido por el experto en la materia. Así, en una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el sustrato es una lámina de plástico, textil o papel. En una realización preferida, la lámina de plástico está constituida por polímeros de alto punto de fusión o alta temperatura de transición vítrea, preferiblemente poli (etilen tereftalato) o poli(carbonato). En otra realización preferida, la lámina de plástico está constituida por poli (cloruro de vinilo) plastificado, cauchos termoplásticos, fibras o tejidos poliméricos.

La primera capa (1) que comprende un material carbonoso se deposita sobre el sustrato de manera que delimita la geometría del sistema de electrodos, tal y como se ha indicado previamente. En una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el material carbonoso de la primera capa se selecciona entre grafito, negro de humo y nanotubos de carbono. En una realización preferida, el material carbonoso es grafito. Así, este puede ser una pasta o tinta de grafito, es decir, una dispersión de grafito.

En una realización particular del sensor electroquímico de la invención, este comprende una capa intermedia que comprende un material metálico y que se deposita sobre el sustrato antes de depositar la primera capa de material carbonoso. Dicho material metálico es cualquier material metálico apropiado del estado de la técnica. Así, en una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el material metálico de esta capa intermedia opcional se selecciona entre plata, oro, platino, paladio, cobre y tungsteno. En una realización preferida, el material metálico de esta capa intermedia opcional es plata. En este caso, esta capa intermedia delimitará la geometría del sistema de electrodos.

La segunda capa (2) se deposita únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia y puede comprender cualquier material metálico adecuado seleccionado por el experto en la materia. Así, en una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el material metálico es Ag/AgCl (plata/cloruro de plata) o Hg/Hg₂Cl₂ (calomelanos). En una realización preferida, el material metálico es Ag/AgCl.

Para proteger del entorno la capa de material carbonoso y delimitar el área de exposición a la muestra que contiene el analito se emplea una tercera capa de material aislante. La tercera capa (3), por tanto, se deposita sobre una parte del sistema de electrodos, siendo dicha parte la que queda entre la superficie de análisis (3a) y los contactos eléctricos (3b) del equipo de medida, de modo que quede expuesta únicamente la parte inferior de los electrodos del sistema de electrodos. El equipo de medida empleado puede ser cualquier equipo de medida adecuado del estado de la técnica tal como un potencióstato, por ejemplo.

Esta tercera capa (3) comprende cualquier material aislante del estado de la técnica adecuado tal como una silicona, una resina epoxi, una pintura acrílica o una pintura vinílica, por ejemplo.

La cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico se deposita únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y se selecciona entre dos posibles capas (d1) y (d2):

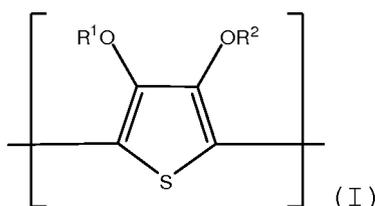
- la capa (d1) comprende una primera capa que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una segunda capa que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre dicha capa de politiofeno; y
- la capa (d2) se corresponde con una única capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

En una realización particular del sensor electroquímico de la invención, la cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico y que se deposita únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo, es la capa (d1) que comprende una primera capa (4a) que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una segunda capa (4b) que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre dicha capa de politiofeno (Figura 2).

En otra realización particular del sensor electroquímico de la invención, la cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico y que se deposita únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo, es la capa (d2) que es una capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno (Figura 3). Esta capa tiene carácter conductor debido a que contiene un polímero conductor como es el politiofeno.

En una realización preferida, el sensor comprende una capa intermedia adicional que comprende un mediador electroquímico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y sobre la que se deposita la capa (d2) de gel polimérico conductor. En este caso, el politiofeno del gel polimérico conductor actuará principalmente como conductor. El mediador electroquímico empleado en esta capa intermedia opcional puede ser cualquier mediador adecuado del estado de la técnica. Así, en una realización aún más preferida, el mediador electroquímico se selecciona entre cobalto ftalocianina (CoPh), 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ), hidroquinona (HQ), quinona (Q), tetratíafulvaleno (TTF) y ferroceno (FC). En una realización mucho más preferida, el mediador electroquímico es cobalto ftalocianina (CoPh).

En una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el politiofeno de la cuarta capa (4) contiene unidades estructurales repetitivas de fórmula (I),



en la que R¹ y R² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₁₂ o forman un grupo 1, n-alquilenos C₁-C₁₂, siendo n = 1-12, opcionalmente sustituidos por un grupo alquilo C₁-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂, vinileno, bencilo, fenilo, halógeno, o por un grupo funcional éster, amino, amido o éter opcionalmente sustituido por un grupo alquilo C₁-C₁₂.

En una realización preferida, en el politiofeno de fórmula (I) los grupos R¹ y R² forman un grupo alquileo seleccionado entre metileno, 1,2-etileno y 1,3-propileno. En una realización aún más preferida, en el politiofeno de fórmula (I) los grupos R¹ y R² forman un grupo 1,2-etileno.

5 Dichos politiofenos en su estado oxidado pueden incorporar adicionalmente grupos aniónicos estabilizando los portadores de carga de tipo positivo deslocalizados en las cadenas poliméricas. Así, en otra realización particular del sensor electroquímico de la invención, el politiofeno de la cuarta capa comprende un dopante aniónico. En una realización preferida, el dopante aniónico es un anión inorgánico seleccionado entre un anión sulfato, cloruro y bromuro. En otra realización preferida, el dopante aniónico es un anión orgánico con grupos sulfonato o fosfato seleccionado entre un ácido p-toluen-sulfónico y un ácido p-toluen-fosfónico. En otra realización preferida, el dopante aniónico es un polianión orgánico seleccionado entre ácidos carboxílicos poliméricos, ácidos sulfónicos poliméricos, o copolímeros de ácidos vinilcarboxílicos y ácidos vinilsulfónicos con otros monómeros polimerizables. En una realización aún más preferida, el dopante aniónico es un polianión orgánico seleccionado entre poli (ácido acrílico), poli(ácido metacrílico) y poli(ácido maleico). En otra realización aún más preferida, el dopante aniónico es un polianión orgánico seleccionado entre ácido poli(estiren sulfónico) y ácido poli(vinil sulfónico). En otra realización aún más preferida, el dopante aniónico es un polianión orgánico seleccionado entre copolímeros de ácidos vinilcarboxílicos y ácidos vinilsulfónicos con estireno y monómeros acrílicos o metacrílicos. En otra realización aún más preferida, el dopante aniónico es un polianión orgánico cuyo peso molecular está comprendido entre 15.000 y 300.000 Daltons.

20 El gel polimérico no conductor de la cuarta capa (4) será cualquier gel polimérico no conductor del estado de la técnica que absorba en su interior la disolución que contiene el analito, preferiblemente un hidrogel polimérico entrecruzado. Así, en una realización particular del sensor electroquímico de la invención, el gel polimérico no conductor se selecciona de entre poli (alcohol vinílico), glutaraldehído, hidroxietilcelulosa, derivados de polimetilmetacrilato, derivados de polietilenglicol y Nafión. En una realización preferida, el gel polimérico no conductor es poli (alcohol vinílico) fotoentrecruzable.

30 En una realización particular del sensor electroquímico de la invención, la cuarta capa (4) comprende además un compuesto biológico. Dicho compuesto biológico reacciona específicamente con determinados analitos, permitiendo cuantificarlos mediante una señal electroquímica. En una realización preferida, el compuesto biológico se selecciona entre enzimas, coenzimas, anticuerpos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, por ejemplo polinucleótidos tipo ARN o ADN de origen sintético o biológico, monosacáridos, oligosacáridos y bacterias.

35 En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la preparación del sensor electroquímico de la invención, en adelante “el procedimiento de la invención”, que comprende:

- (A) obtener sobre el sustrato la primera capa que comprende un material carbonoso y que constituye el sistema de electrodos compuesto al menos por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;
- 40 (B) obtener la segunda capa que comprende un material metálico únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia;
- 45 (C) obtener la tercera capa que comprende material aislante sobre la parte del sistema de electrodos que queda entre la superficie de análisis y los contactos eléctricos del equipo de medida de modo que deje expuesta únicamente la parte inferior de los electrodos del sistema de electrodos; y
- (D) obtener la cuarta capa que comprende politiofeno y gel polimérico únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo

50 En una realización particular del procedimiento de la invención, la cuarta capa que comprende politiofeno y gel polimérico se obtiene mediante un método seleccionado entre (D1) y (D2), donde:

- 55 (D1) comprende obtener la capa que comprende un politiofeno sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y obtener después la capa que comprende un gel polimérico sobre la capa que comprende un politiofeno; y
- (D2) comprende obtener la capa que comprende un gel polimérico y un politiofeno sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo.

60 En una realización preferida, la obtención de la cuarta capa comprende:

(i) la aplicación de disoluciones verdaderas, dispersiones coloidales o dispersiones estables de partículas finamente divididas, bien acuosas bien base disolvente, de politiofeno previamente obtenidas mediante polimerización oxidativa o polimerización enzimática; o

65 (ii) la aplicación de disoluciones, bien acuosas bien base disolvente, de monómeros tiofeno y posterior polimerización *in situ* de los mismos.

En particular, con respecto al método (D1), se aplica sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una disolución verdadera, una dispersión coloidal o una dispersión estable de partículas finamente divididas, bien acuosa bien base disolvente, de un politiofeno previamente obtenida mediante polimerización oxidativa o polimerización enzimática. Dicha aplicación se efectúa mediante diferentes técnicas conocidas tal como pintado, inmersión, recubrimiento por rotación (“spin-coating”) o serigrafía (“screen-printing”), por ejemplo. Tras la aplicación de dicha disolución o dispersión de politiofeno se procede a la evaporación directa del disolvente. En otra variante, se aplica sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una disolución de monómeros tiofeno de un modo análogo al previamente descrito y, después, se procede a la polimerización *in situ* de dichos monómeros y a la posterior evaporación del disolvente.

A continuación, y de modo análogo, se aplica manualmente sobre la capa de politiofeno así obtenida una disolución de prepolímero de un gel polimérico no conductor. Tras la aplicación de dicha disolución se procede a la reticulación del prepolímero mediante cualquier técnica conocida tal como la exposición a luz halógena, por ejemplo, y después a la evaporación directa del disolvente.

Por otro lado, con respecto al método (D2), se aplica sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una disolución verdadera, una dispersión coloidal o una dispersión estable de partículas finamente divididas, bien acuosa bien base disolvente, de politiofeno mezclada con una disolución del gel polimérico no conductor. Tras la aplicación de dicha mezcla se procede a la evaporación directa del disolvente.

Como alternativa, se aplica sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una disolución del gel polimérico no conductor que comprende los monómeros de tiofeno. Dicha aplicación se efectúa manualmente. Tras la aplicación de dicha disolución se procede a la polimerización de los monómeros tiofeno en el seno del gel polimérico no conductor mediante polimerización *in-situ* (polimerización oxidativa o polimerización enzimática) y, posteriormente, a la reticulación del prepolímero mediante cualquier técnica conocida tal como la exposición a luz halógena, por ejemplo. Finalmente, se procede a la evaporación directa del disolvente.

En cualquier caso, en el procedimiento de la invención el politiofeno se sintetiza químicamente, método que es mucho más sencillo y menos costoso que la síntesis electroquímica del mismo.

Estos métodos de polimerización oxidativa, polimerización enzimática o polimerización *in situ* del monómero correspondiente pueden ser los descritos en las referencias ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS 14, 615-622, 2004 y BIOMACROMOLECULES 8(2), 315-317, 2007. Entre los disolventes preferibles están los alcoholes (metanol, etanol o isopropanol, por ejemplo), así como mezclas de agua con estos alcoholes u otros disolventes orgánicos miscibles con el agua tal como la acetona, por ejemplo. Para la polimerización oxidativa, se pueden emplear como oxidantes preferidos el persulfato amónico, el tricloruro de hierro o el tosilato férrico. Para la polimerización enzimática, se pueden emplear como enzimas preferidas la peroxidasa del rábano o peroxidases de otros orígenes. Adicionalmente, pueden emplearse ligantes poliméricos del tipo poli(vinil alcohol), poli(vinil acetato), etc. y promotores de adhesión, del tipo silanos, resinas tackificantes, etc. para facilitar la formación de filmes altamente adherentes sobre la capa correspondiente.

De un modo análogo, el resto de capas que comprende el sensor electroquímico de la invención se pueden obtener por aplicación de la dispersión o disolución correspondiente sobre la capa anterior mediante diferentes técnicas conocidas tal como pintado, inmersión, recubrimiento por rotación (“spin-coating”) o serigrafía (“screen-printing”), por ejemplo, seguida de la evaporación directa del disolvente.

En una realización particular del procedimiento de la invención, este comprende obtener una capa intermedia que comprende un material metálico sobre el sustrato previamente a la obtención de la primera capa.

En otra realización particular del procedimiento de la invención, este comprende obtener una capa intermedia que comprende un mediador electroquímico sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo previamente a la obtención de la capa (d2) de gel polimérico conductor, tal y como se ha indicado previamente.

Estas capas intermedias opcionales se pueden obtener también por aplicación de la dispersión o disolución correspondiente sobre la capa anterior mediante las diferentes técnicas mencionadas, seguida de la evaporación directa del disolvente.

El sensor electroquímico de la invención puede emplearse para la detección de analitos de distinta naturaleza tal como, por ejemplo, pesticidas (organofosfatos y carbamatos, por ejemplo), patógenos, metales pesados, neurotransmisores, metabolitos, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

65

Ejemplo 1

Preparación de un sensor electroquímico para la detección del pesticida clorpirifós oxon que comprende una primera capa de grafito y una cuarta capa que comprende, a su vez, una capa de PEDOT sobre la que se deposita una capa de PVA (capa (d1))

Se preparó un sensor electroquímico de tres electrodos según la invención para la detección de clorpirifós oxon, un pesticida organofosfato, basado en la inhibición de la producción de tiocolina, según el siguiente procedimiento. 1) Se imprimieron 3 pistas de una tinta conductora de grafito comercial (Electrodag PF-410) mediante serigrafía “screen printing” sobre un soporte plástico de policarbonato PC. 2) Se imprimió mediante serigrafía “screen printing” una capa de una tinta de Ag/AgCl comercial (Electromag. 6037 SS) únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia. 3) Se imprimió mediante serigrafía “screen printing” una capa protectora de pintura vinílica comercial (Electrodag 452 SS) sobre parte de los 3 electrodos, dejando expuesta únicamente la parte inferior del electrodo de trabajo, del electrodo de referencia y del contraelectrodo. 4a) Se imprimió mediante serigrafía “screen printing” sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una capa de una dispersión acuosa de polietilendioxitiofeno (PEDOT) al 1% en peso de politiofeno (preparada previamente a partir de una solución acuosa de monómero etilendioxitiofeno EDOT comercial (99%, Sigma-Aldrich Chemicals), 0,1 M y poli-estirensulfonato PSS comercial (Sigma-Aldrich Chemicals), 0,1 M como dopante-estabilizante a temperatura ambiente, que se agitó vigorosamente, se le añadió el oxidante persulfato amónico (0,1 M) y se dejó polimerizar). 4b) Se depositó manualmente sobre la capa de PEDOT una mezcla de disolución acuosa de polivinilalcohol fotoentrecruzable (PVA) comercial (Aldrich) al 6% en peso y una disolución de enzima acetilcolinesterasa comercial (de anguila eléctrica tipo V-S de Sigma) en tampón fosfato. La actividad de la disolución enzimática era de entre 0,07 y 0,18 UA/min según la relación PVA/enzima de la mezcla (30/70, 50/50 o 70/30). En cualquiera de los casos, se inmovilizó en el electrodo de trabajo 1 mU enzimática (cantidad necesaria para catalizar la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto). La enzima quedó atrapada en el electrodo de trabajo tras la reticulación del prepolímero mediante exposición a luz halógena o Neón, de $\lambda > 400$ nm, durante 24-72 horas, dependiendo de la cantidad de PVA en la mezcla PVA/enzima.

El sensor así obtenido presentaba la estructura en capas definida en la Figura 1 (vista superior) y en la Figura 2 (vista lateral), con las siguientes áreas de los electrodos:

Área del electrodo de trabajo: 58,09 mm²

Área del electrodo de referencia: 3,74 mm²

Área del contraelectrodo: 7,9 mm²

y las siguientes relaciones entre dichas áreas:

Área del electrodo de referencia/Área electrodo de trabajo = 0,064 mm²

Área contraelectrodo/Área electrodo de trabajo = 0,136 mm²

Tras obtener el sensor, se procedió a determinar la concentración de clorpirifós oxon en una disolución acuosa. Para ello, se depositó cloruro de acetiltiocolina (una gota de 30 μ l, 50 mM) sobre la superficie de análisis del sensor, con lo que se produjo tiocolina enzimáticamente. La oxidación de esta tiocolina se determinó en el sensor a un potencial de 100 mV, con el compuesto politiofeno como mediador. La concentración de cloruro de acetil tiocolina necesaria para la obtención de una señal de intensidad de corriente máxima en el sensor se define como “concentración de saturación”. Tomando las condiciones de saturación como referencia, en presencia del pesticida clorpirifós oxon, la señal de intensidad de corriente obtenida es menor por la desactivación enzimática que produce el pesticida en el sensor. Esta disminución de la señal en presencia de diferentes concentraciones de pesticida posibilita la calibración del sensor, y posteriormente, su utilización en la cuantificación del pesticida en la disolución a ensayar.

Así, se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 4.

TABLA 1

Porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon

Concentración de pesticida Clorpirifós oxon (M)	% de inhibición en presencia de pesticida	Desviación estándar	N° de medidas entre las que se ha realizado el promedio
$2 \cdot 10^{-10}$	7,21	6,30	8
$3 \cdot 10^{-10}$	16,11	8,64	8
$4 \cdot 10^{-10}$	22,41	6,35	8
$5 \cdot 10^{-10}$	27,09	6,61	6
$9 \cdot 10^{-10}$	44,54	5,94	6
$1 \cdot 10^{-9}$	46,82	6,33	7
$3 \cdot 10^{-9}$	69,20	6,51	7

Como puede verse, los límites de detección son muy bajos, ya que es posible detectar $2 \cdot 10^{-10}$ M de pesticida con un 7% de inhibición.

Ejemplo 2

Preparación de un sensor electroquímico para la detección del pesticida clorpirifós oxon que comprende una primera capa de grafito y una cuarta capa de PEDOT y PVA (capa (d2))

Se preparó un sensor electroquímico de tres electrodos según la invención para la detección de clorpirifós oxon, un pesticida organofosfato, basado en la inhibición de la producción de tiocolina, según el siguiente procedimiento. Las primeras 3 capas se depositaron de manera idéntica a la descripción realizada en el ejemplo 1. A continuación, se procedió tal como sigue. 4) Se depositó manualmente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una disolución acuosa de polivinilalcohol fotoentrecruzable comercial (Aldrich) al 6% en peso, conteniendo la enzima acetilcolinesterasa comercial (de anguila eléctrica tipo V-S de Sigma) de actividad definida en su interior (entre 0,07 y 0,18 UA/min según fuera la relación PVA/enzima de la mezcla (30/70, 50/50 o 70/30), y una solución de monómero etilendioxitiofeno EDOT comercial (99%, Sigma-Aldrich Chemicals) 0,1 M. El monómero se hizo polimerizar mediante polimerización enzimática empleando la enzima Peroxidasa de rábano (HRP tipo VI de Sigma)/ H_2O_2 (0,3 mg/ml) y, finalmente, el prepolímero de PVA se retículo mediante exposición a luz halógena o Neón, de $\lambda > 400$ nm, durante 24-72 horas, dependiendo de la cantidad de PVA en la mezcla PVA/enzima, quedando la enzima finalmente atrapada dentro de un gel polimérico conductor.

El sensor así obtenido presentaba la estructura en capas definida en la Figura 1 (vista superior) y en la Figura 3 (vista lateral), con las áreas y relaciones de áreas del Ejemplo 1.

Tras obtener el sensor de la invención, se procedió a determinar la concentración de clorpirifós oxon en una disolución acuosa. Para ello, se depositó cloruro de acetiltiocolina (una gota de $30 \mu\text{l}$, 50 mM) sobre la superficie de análisis del sensor, con lo que se produjo tiocolina enzimáticamente. La oxidación de esta tiocolina se determinó en el sensor a un potencial de 100 mV, con el compuesto politiofeno como mediador. La concentración de cloruro de acetil tiocolina necesaria para la obtención de una señal de intensidad de corriente máxima en el sensor se define como "concentración de saturación". Tomando las condiciones de saturación como referencia, en presencia del pesticida clorpirifós oxon, la señal de intensidad de corriente obtenida es menor por la desactivación enzimática que produce el pesticida en el sensor. Esta disminución de la señal en presencia de diferentes concentraciones de pesticida posibilita la calibración del sensor, y posteriormente, su utilización en la cuantificación del pesticida en la disolución a ensayar.

Así, se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 5.

TABLA 2

Porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon

Concentración de pesticida Clorpirifós oxon (M)	% de inhibición en presencia de pesticida	Desviación estándar	Número de medidas entre las que se ha realizado el promedio
$2 \cdot 10^{-10}$	-	-	-
$3 \cdot 10^{-10}$	10,09	8,55	8
$4 \cdot 10^{-10}$	15,31	7,24	8
$5 \cdot 10^{-10}$	22,19	8,72	6
$9 \cdot 10^{-10}$	39,75	7,76	6
$1 \cdot 10^{-9}$	41,71	7,34	7
$3 \cdot 10^{-9}$	61,15	7,93	7

Como puede verse, los límites de detección son muy bajos, ya que es posible detectar $3 \cdot 10^{-10}$ M de pesticida con un 10% de inhibición.

Ejemplo 3

Preparación de un sensor electroquímico para la detección del pesticida clorpirifós oxon que comprende una primera capa de grafito y una capa intermedia de cobalto ftalocianina sobre la que se deposita la cuarta capa de PEDOT y PVA (capa (d2))

Se preparó un sensor electroquímico de tres electrodos según la invención para la detección de clorpirifós oxon, un pesticida organofosfato, basado en la inhibición de la producción de tiocolina, según el siguiente procedimiento. Las primeras 3 capas se depositaron de manera idéntica a la descripción realizada en el ejemplo 1. A continuación, se procedió tal como sigue. 3')- Se depositó mediante serigrafía "screen printing" sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una capa de una dispersión (3,8 mg/ml) de cobalto ftalocianina (CoPh) obtenida mediante la disolución de CoPh comercial (Sigma) en una solución acuosa de hidroxietilcelulosa (HEC) al 4%. 4) Se depositó manualmente sobre la capa anterior una disolución acuosa de polivinilalcohol fotoentrecruzable comercial (Aldrich) al 6% en peso, conteniendo la enzima acetilcolinesterasa comercial (de anguila eléctrica tipo V-S de Sigma) de actividad definida en su interior (entre 0,07 y 0,18 UA/min según fuera la relación PVA/enzima de la mezcla (30/70, 50/50 o 70/30), y una solución de monómero etilendioxitiofeno EDOT comercial (99%, Sigma-Aldrich Chemicals) 0,1 M. El monómero se hizo polimerizar mediante polimerización enzimática empleando la enzima Peroxidasa de rábano (HRP tipo VI de Sigma)/H₂O₂ (0,3 mg/ml) y, finalmente, el prepolímero de PVA se retículo mediante exposición a luz halógena o Neón, de $\lambda > 400$ nm, durante 24-72 horas, dependiendo de la cantidad de PVA en la mezcla PVA/enzima, quedando la enzima finalmente atrapada dentro de un gel polimérico conductor.

El sensor así obtenido presentaba la estructura en capas definida en la Figura 1 (vista superior) y en la Figura 3 (vista lateral), con las áreas y relaciones de áreas del Ejemplo 1.

Tras obtener el sensor de la invención, se procedió a determinar la concentración de clorpirifós oxon en una disolución acuosa. Para ello, se depositó cloruro de acetiltiocolina (una gota de 30 μ l, 50 mM) sobre la superficie de análisis del sensor, con lo que se produjo tiocolina enzimáticamente. La oxidación de esta tiocolina se determinó en el sensor a un potencial de 100 mV, con el compuesto politiofeno como mediador. La concentración de cloruro de acetil tiocolina necesaria para la obtención de una señal de intensidad de corriente máxima en el sensor se define como "concentración de saturación". Tomando las condiciones de saturación como referencia, en presencia del pesticida clorpirifós oxon, la señal de intensidad de corriente obtenida es menor por la desactivación enzimática que produce el pesticida en el sensor. Esta disminución de la señal en presencia de diferentes concentraciones de pesticida posibilita la calibración del sensor, y posteriormente, su utilización en la cuantificación del pesticida en la disolución a ensayar.

Así, se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 6.

TABLA 3

Porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon

Concentración de pesticida Clorpirifós oxon (M)	% de inhibición en presencia de pesticida	Desviación estándar	Número de medidas entre las que se ha realizado el promedio
$2 \cdot 10^{-10}$	9,82	6,06	8
$3 \cdot 10^{-10}$	10,70	2,36	8
$4 \cdot 10^{-10}$	32,51	5,43	8
$5 \cdot 10^{-10}$	31,46	3,91	6
$9 \cdot 10^{-10}$	49,18	6,51	6
$1 \cdot 10^{-9}$	52,36	7,65	7
$3 \cdot 10^{-9}$	74,80	5,62	7

Como puede verse, los límites de detección son muy bajos, ya que es posible detectar $2 \cdot 10^{-10}$ M de pesticida con un 9% de inhibición.

Ejemplo 4

Preparación de un sensor electroquímico para la detección del pesticida clorpirifós oxon que comprende una capa intermedia de plata sobre la que se deposita una primera capa de grafito y una cuarta capa que comprende, a su vez, una capa de PEDOT sobre la que se deposita una capa de PVA (capa (d1))

Se preparó un sensor electroquímico de tres electrodos según la invención para la detección de clorpirifós oxon, un pesticida organofosfato, basado en la inhibición de la producción de tiocolina, según el siguiente procedimiento. 1) Se imprimieron tres pistas de una tinta conductora de plata comercial (Acheson) mediante serigrafía "screen printing" sobre un soporte plástico de policarbonato PC. 1) Se imprimieron 3 pistas de una tinta conductora de grafito comercial (Electrodag PF-410) mediante serigrafía "screen printing" sobre la capa de plata anterior. Las capas 2 y 3 se depositaron de manera idéntica a cómo se efectuó en el ejemplo 1. 4a) Se imprimió mediante serigrafía "screen printing" sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo una capa de una dispersión acuosa de polietilendioxitiofeno (PEDOT) al 1% en peso de poliotiofeno preparada previamente. Para ello, se disolvieron cantidades equimolares de monómero etilendioxitiofeno EDOT (0,1 M) y dopante-estabilizante poliestirensulfonato PSS (0,1 M) en agua a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 2 mediante adición de HCl; a continuación, se añadieron 0,3 mg/ml de peroxidasa de rábano comercial (HRP tipo VI de Sigma) y una cantidad equimolar de H_2O_2 (0,055 M) y se dejó polimerizar durante 16 horas a 4°C obteniendo una dispersión de aproximadamente un 1% de PEDOT en agua. 4b) Se depositó manualmente sobre la capa de PEDOT una mezcla de disolución acuosa de polivinilalcohol fotoentrecruzable (PVA) comercial (Aldrich) al 6% en peso y una disolución de enzima acetilcolinesterasa comercial (de anguila eléctrica tipo V-S de Sigma) en tampón fosfato. La actividad de la disolución enzimática era de entre 0,07 y 0,18 UA/min según la relación PVA/enzima de la mezcla (30/70, 50/50 o 70/30). En cualquiera de los casos, se inmovilizó en el electrodo de trabajo 1 mU enzimática (cantidad necesaria para catalizar la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto). La enzima quedó atrapada en el electrodo de trabajo tras la reticulación del prepolímero mediante exposición a luz halógena o Neón, de $\lambda > 400$ nm, durante 24-72 horas, dependiendo de la cantidad de PVA en la mezcla PVA/enzima.

El sensor así obtenido presentaba la estructura en capas definida en la Figura 1 (vista superior) y en la Figura 2 (vista lateral), con las áreas y relaciones de áreas del Ejemplo 1.

Tras obtener el sensor de la invención, se procedió a determinar la concentración de clorpirifós oxon en una disolución acuosa. Para ello, se depositó cloruro de acetiltiocolina (una gota de 30 μ l, 50 mM) sobre la superficie de análisis del sensor, con lo que se produjo tiocolina enzimáticamente. La oxidación de esta tiocolina se determinó en el sensor a un potencial de 100 mV, con el compuesto poliotiofeno como mediador. La concentración de cloruro de acetil tiocolina necesaria para la obtención de una señal de intensidad de corriente máxima en el sensor se define como "concentración de saturación". Tomando las condiciones de saturación como referencia, en presencia del pesticida clorpirifós oxon, la señal de intensidad de corriente obtenida es menor por la desactivación enzimática que produce el

pesticida en el sensor. Esta disminución de la señal en presencia de diferentes concentraciones de pesticida posibilita la calibración del sensor, y posteriormente, su utilización en la cuantificación del pesticida en la disolución a ensayar.

Así, se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 7.

TABLA 4

Porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de distintas concentraciones de clorpirifós oxon

Concentración de pesticida Clorpirifós oxon (M)	% de inhibición en presencia de pesticida	Desviación estándar	Número de medidas entre las que se ha realizado el promedio
$2 \cdot 10^{-10}$	8,28	6,40	8
$3 \cdot 10^{-10}$	19,14	7,67	8
$4 \cdot 10^{-10}$	24,51	7,37	8
$5 \cdot 10^{-10}$	30,10	5,64	6
$9 \cdot 10^{-10}$	47,55	3,84	6
$1 \cdot 10^{-9}$	49,50	5,43	7
$3 \cdot 10^{-9}$	72,23	4,62	7

Como puede verse, los límites de detección son muy bajos, ya que es posible detectar $2 \cdot 10^{-10}$ M de pesticida con un 8% de inhibición.

REIVINDICACIONES

1. Sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos **caracterizado** porque comprende:

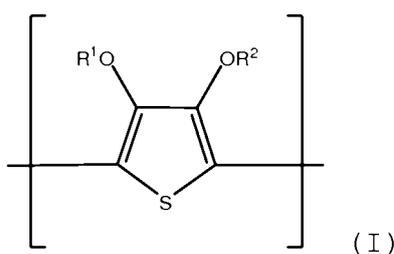
- 5
- (a) una primera capa (1) que comprende un material carbonoso depositada sobre un sustrato, constituyendo dicha capa el sistema de electrodos del sensor electroquímico que está compuesto al menos por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;
- 10
- (b) una segunda capa (2) que comprende un material metálico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia;
- 15
- (c) una tercera capa (3) que comprende un material aislante depositada sobre una parte del sistema de electrodos, siendo dicha parte la que queda entre la superficie de análisis (3a) y los contactos eléctricos (3b) del equipo de medida, de modo que quede expuesta únicamente la parte inferior de los electrodos del sistema de electrodos;
- 20
- (d) una cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo seleccionada entre (d1) y (d2), donde:
- (d1) comprende una capa que comprende un politiofeno depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y una capa que comprende un gel polimérico no conductor depositada sobre dicha capa de politiofeno; y
- 25
- (d2) es una capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

2. Sensor según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cuarta capa (4) que comprende politiofeno y gel polimérico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo es la capa (d2) de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno.

3. Sensor según la reivindicación 2, **caracterizado** porque comprende una capa adicional que comprende un mediador electroquímico depositada únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y sobre la que se deposita la capa (d2) de gel polimérico conductor.

4. Sensor según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una capa intermedia que comprende un material metálico depositada sobre el sustrato y sobre la que se deposita la primera capa.

5. Sensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el politiofeno contiene unidades estructurales repetitivas de fórmula (I),



55 en la que R¹ y R² son independientemente un grupo alquilo C₁-C₁₂ o forman un grupo 1, n-alquileo C₁-C₁₂, siendo n = 1-12, opcionalmente sustituidos por un grupo alquilo C₁-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂, vinileno, bencilo, fenilo, halógeno, o por un grupo funcional éster, amino, amido o éter opcionalmente sustituido por un grupo alquilo C₁-C₁₂.

60 6. Sensor según la reivindicación 5, **caracterizado** porque en el politiofeno los grupos R¹ y R² forman un grupo alquileo seleccionado entre metileno, 1,2-etileno y 1,3-propileno.

7. Sensor según la reivindicación 6, **caracterizado** porque en el politiofeno los grupos R¹ y R² forman un grupo 1,2-etileno.

65 8. Sensor según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el politiofeno comprende un dopante aniónico.

9. Sensor según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el dopante aniónico es un anión inorgánico seleccionado entre un anión sulfato, cloruro y bromuro; un anión orgánico con grupos sulfonato o fosfato seleccionado entre un ácido p-toluen-sulfónico y un ácido p-toluen-fosfónico; o un polianión orgánico seleccionado entre ácidos carboxílicos poliméricos, preferiblemente poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico) o poli(ácido maleico); ácidos sulfónicos poliméricos, preferiblemente ácido poli (estiren sulfónico) o ácido poli (vinil sulfónico); o copolímeros de ácidos vinilcarboxílicos y ácidos vinilsulfónicos con otros monómeros polimerizables, preferiblemente estireno y monómeros acrílicos o metacrílicos.

10. Sensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el material carbonoso de la primera capa se selecciona entre grafito, negro de humo y nanotubos de carbono.

11. Sensor según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el material carbonoso es grafito.

12. Sensor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la cuarta capa comprende además un compuesto biológico.

13. Sensor según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el compuesto biológico se selecciona entre enzimas, coenzimas, anticuerpos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, monosacáridos, oligosacáridos y bacterias.

14. Procedimiento para la preparación de un sensor electroquímico según las reivindicaciones 1-13, **caracterizado** porque comprende:

(A) obtener sobre el sustrato la primera capa que comprende un material carbonoso y que constituye el sistema de electrodos compuesto al menos por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo;

(B) obtener la segunda capa que comprende un material metálico únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de referencia;

(C) obtener la tercera capa que comprende material aislante sobre la parte del sistema de electrodos que queda entre la superficie de análisis y los contactos eléctricos del equipo de medida de modo que deje expuesta únicamente la parte inferior de los electrodos del sistema de electrodos; y

(D) obtener la cuarta capa que comprende politiofeno y gel polimérico únicamente sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo.

15. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la cuarta capa que comprende politiofeno y gel polimérico se obtiene mediante un método seleccionado entre (D1) y (D2), donde:

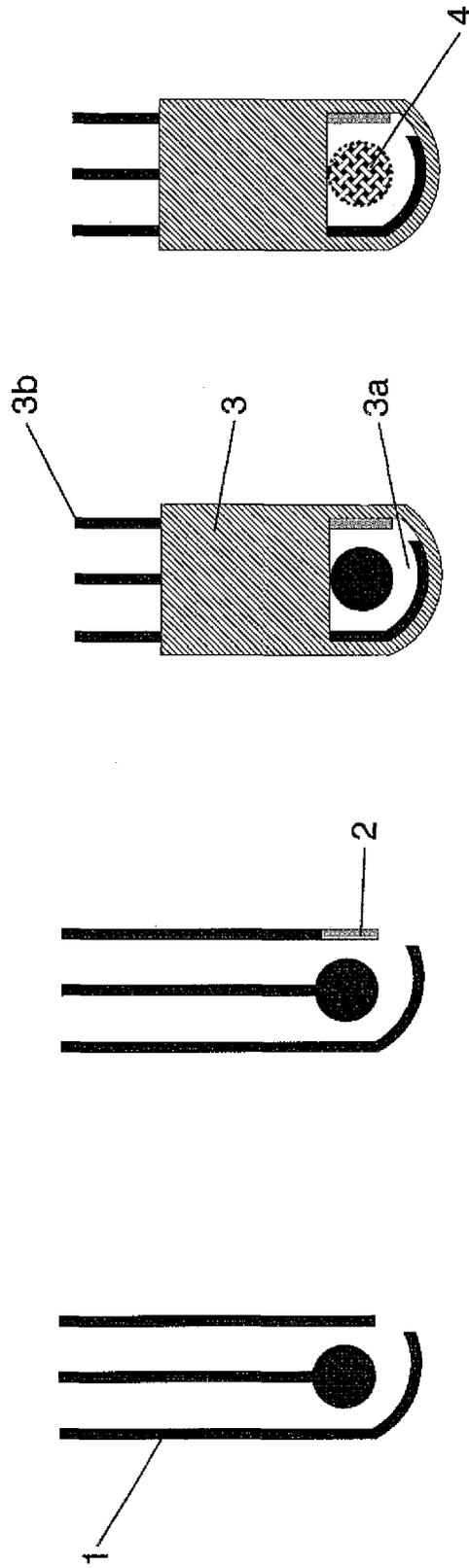
(D1) comprende obtener la capa que comprende un politiofeno sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo y obtener después la capa que comprende un gel polimérico no conductor sobre la capa que comprende un politiofeno; y

(D2) comprende obtener la capa de gel polimérico conductor que comprende un gel polimérico no conductor y un politiofeno sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, **caracterizado** porque la obtención de la cuarta capa comprende:

(i) la aplicación de disoluciones verdaderas, dispersiones coloidales o dispersiones estables de partículas finamente divididas, bien acuosas bien base disolvente, de politiofeno previamente obtenidas mediante polimerización oxidativa o polimerización enzimática; o

(ii) la aplicación de disoluciones, bien acuosas bien base disolvente, de monómeros tiofeno y posterior polimerización *in situ* de los mismos.



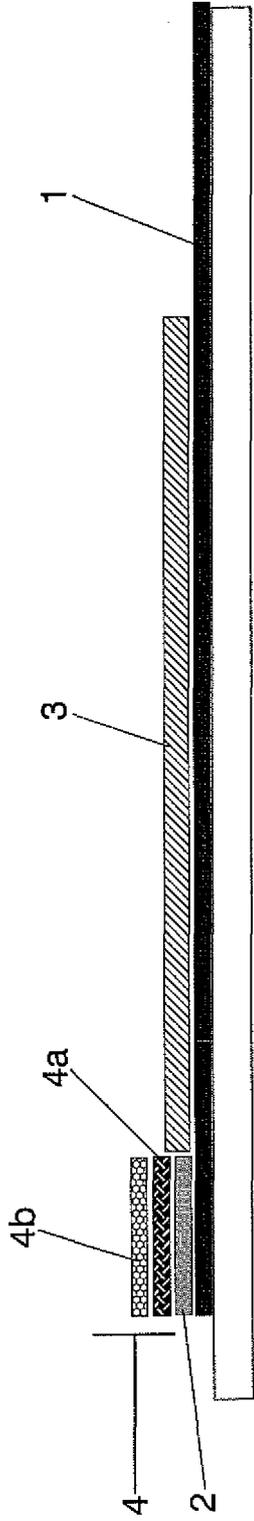


FIG. 2

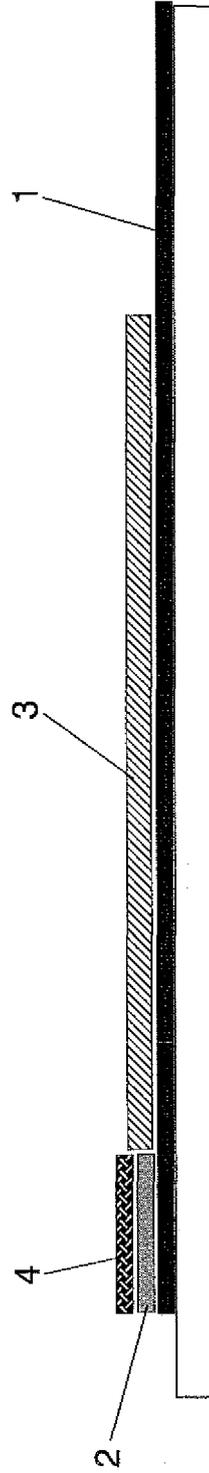


FIG. 3

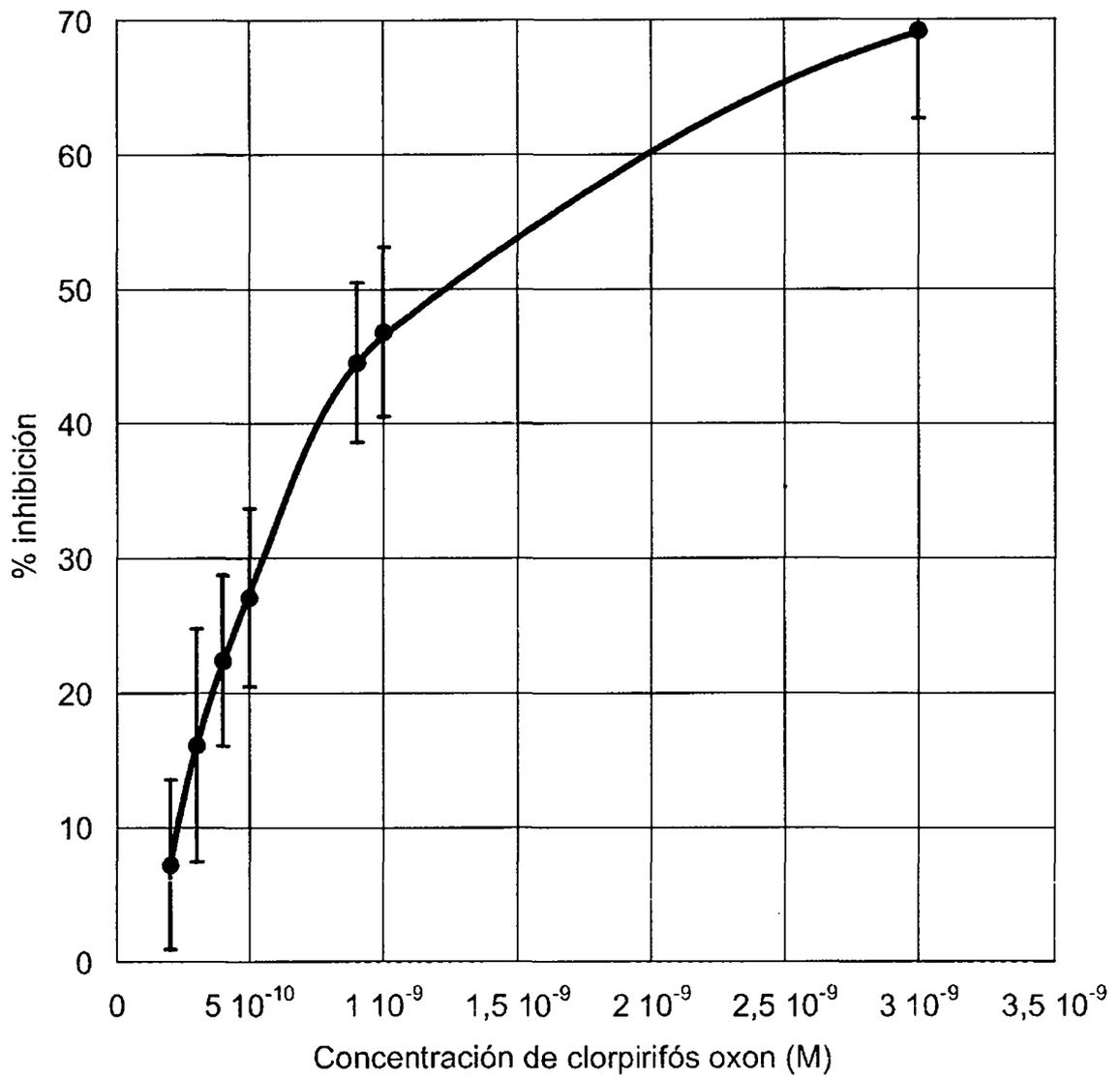


FIG. 4

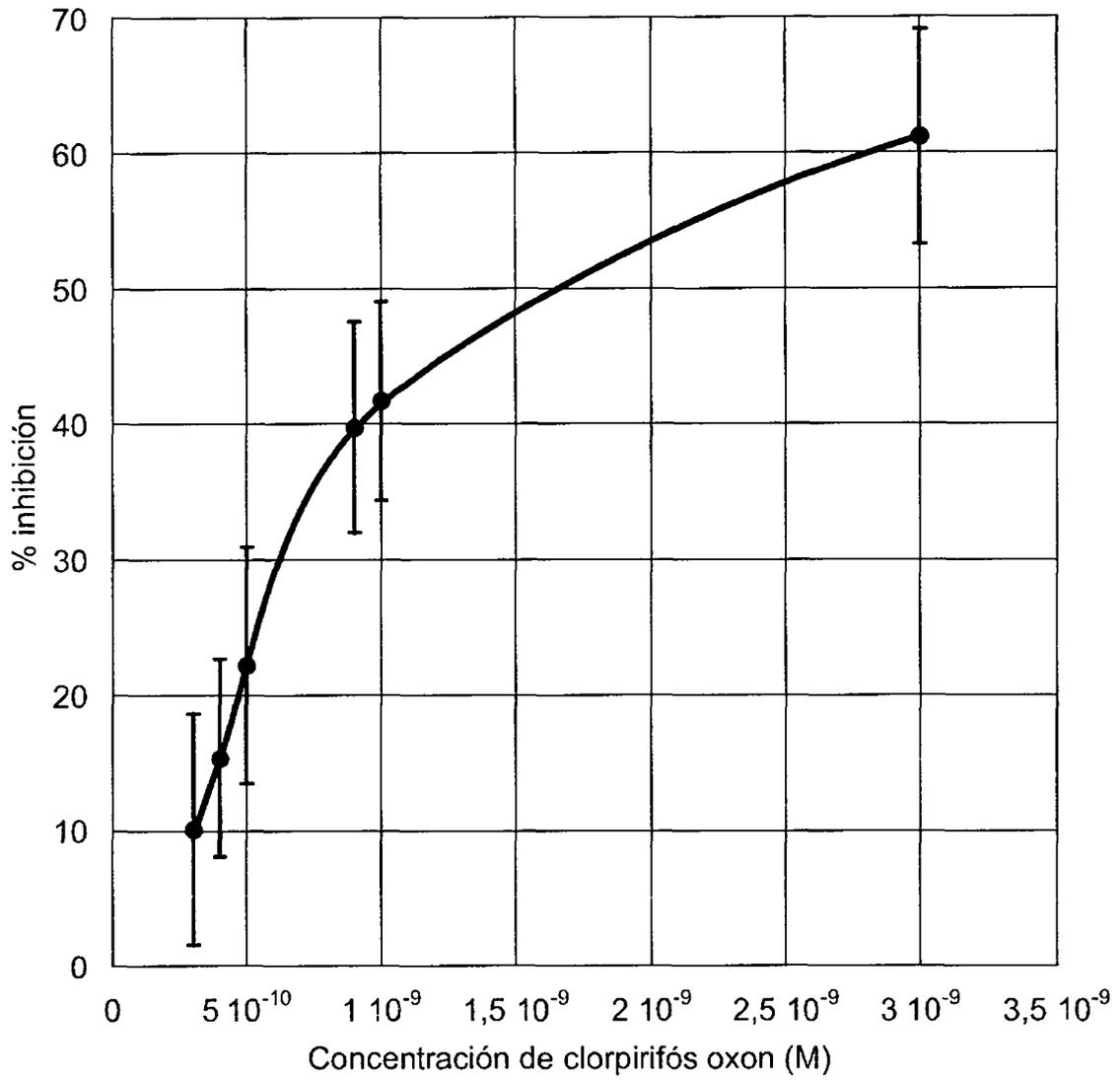


FIG. 5

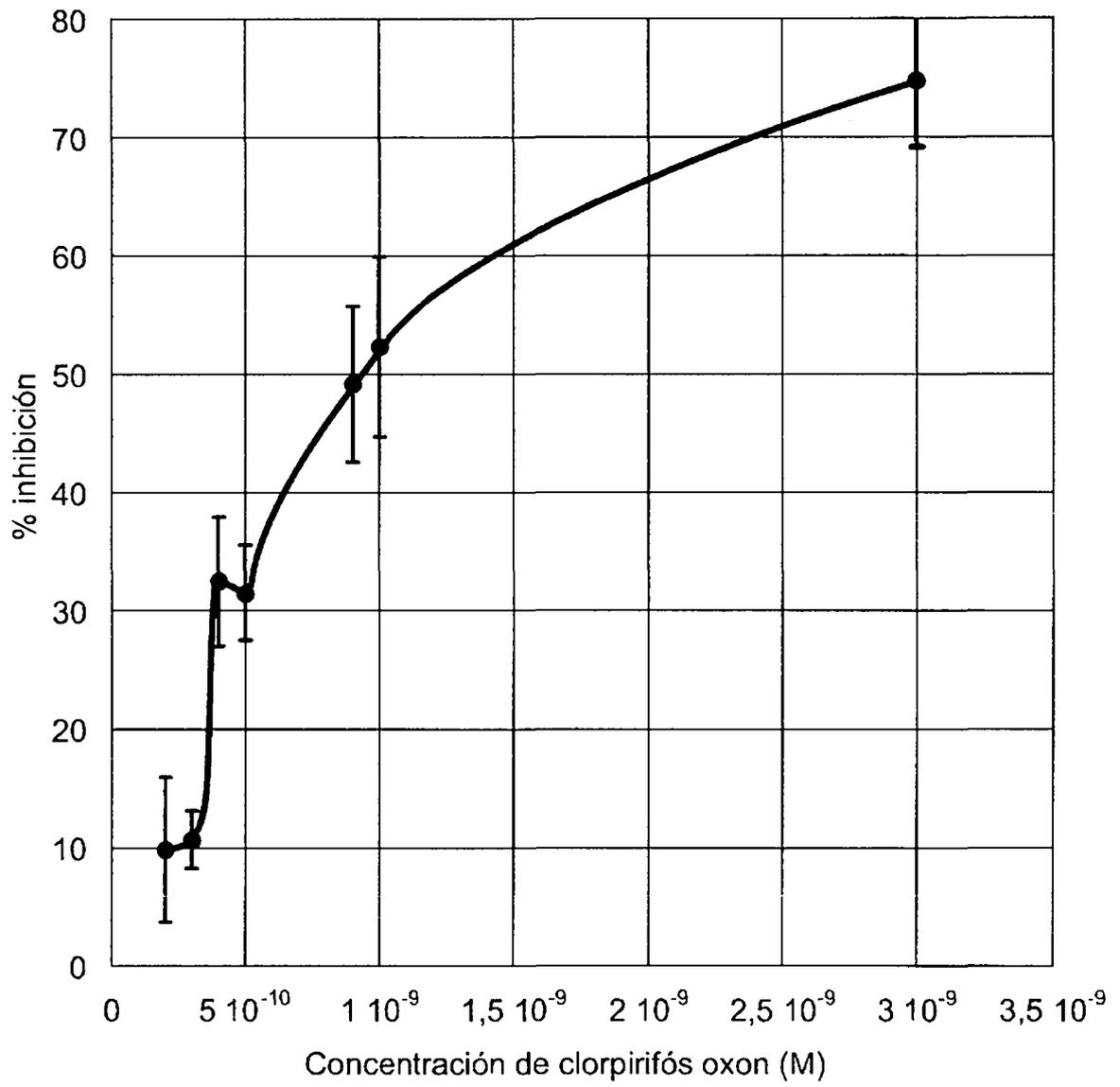


FIG. 6

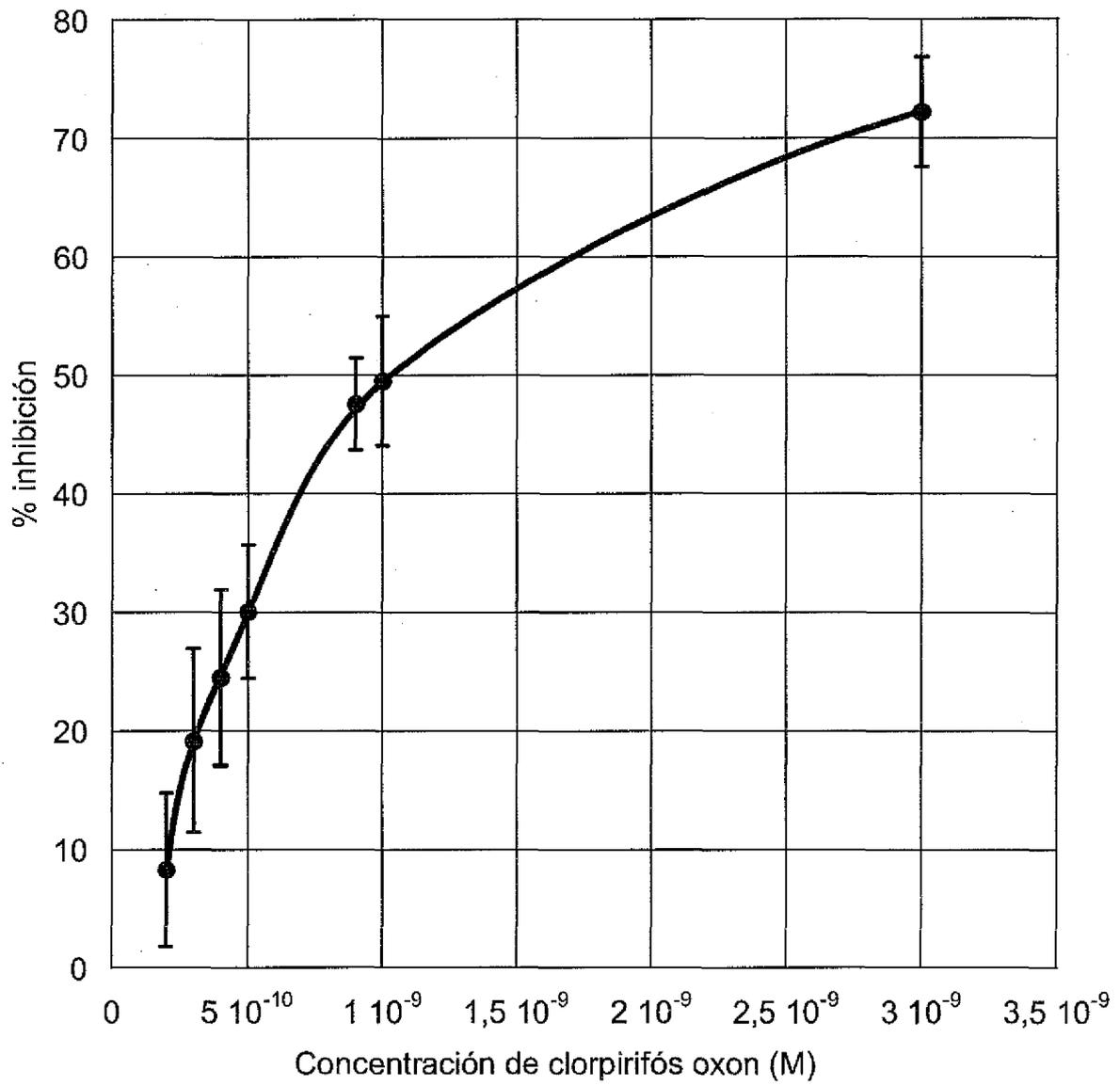


FIG. 7



②① N.º solicitud: 200930539

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ISTAMBOULIE, G., et al., The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorfenvinfos, Talanta, 2009, Vol. 79, págs. 507-511. Resumen; apartados: 2.1, 2.3 y 2.4.	1-16
A	VALDES-RAMIREZ, G., et al., Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile, Anal. Bioanal. Chem., 2008, Vol. 392, págs. 699-707. Resumen; apartado: "Experimental"; fig. 1.	1-16
A	ISTAMBOULIE, G., et al., Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase, Biosensors and Bioelectronics, 2007, Vol. 23, págs. 506-512. Resumen; apartados: 2.2 y 2.6.	1-16
A	GERARD, M., et al., Application of conducting polymers to biosensors, Biosensors and Bioelectronics, 2002, Vol. 17, págs. 345-359. Resumen; apartados: 2 y 4.	1-16
A	KROS, A., et al., Poly(pyrrole) versus poly(3,4-ethylenedioxythiophene): implications for biosensor applications, Sensors and Actuators B, 2005, Vol. 106, págs. 289-295. Resumen.	1-16
A	WO 2006009324 A1 (CANON KABUSHIKI KAISHA) 26.01.2006, resumen; ejemplo 4.	1-16

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
19.04.2011

Examinador
M. García Poza

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/00 (2006.01)

G01N27/30 (2006.01)

G01N33/487 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ISTAMBOULIE, G., et al., The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorfenvinfos, <i>Talanta</i> , 2009, Vol. 79, págs. 507-511.	
D02	VALDES-RAMIREZ, G., et al., Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile, <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> , 2008, Vol. 392, págs. 699-707.	
D03	ISTAMBOULIE, G., et al., Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase, <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 2007, Vol. 23, págs. 506-512.	
D04	GERARD, M., et al., Application of conducting polymers to biosensors, <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 2002, Vol. 17, págs. 345-359.	
D05	KROS, A., et al., Poly(pyrrole) versus poly(3,4-ethylenedioxythiophene): implications for biosensor applications, <i>Sensors and Actuators B</i> , 2005, Vol. 106, págs. 289-295.	
D06	WO 2006009324 A1 (CANON KABUSHIKI KAISHA)	26.01.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos.

El documento D01 divulga biosensores de acetilcolinesterasa desarrollados para resolver mezclas de dos pesticidas. Estos sensores tienen un sistema de tres electrodos: el electrodo de trabajo de carbono modificado con cobalto ftalocianina (CoPh), el contraelectrodo de grafito y el electrodo de referencia de Ag/AgCl. Sobre el electrodo de trabajo se encuentran las enzimas inmovilizadas por un fotopolímero basado en poli(vinil alcohol).

El documento D02 divulga biosensores de acetilcolinesterasa desarrollados para cuantificación de diferentes pesticidas. Estos sensores tienen un sistema de tres electrodos que se forman con las siguientes capas: una capa conductora de plata, una capa de carbono, una capa de Ag/AgCl sobre el electrodo de referencia, una capa de Co-Ph sobre el electrodo de trabajo y finalmente una capa aislante. Las enzimas se colocan sobre el electrodo de trabajo inmovilizadas por una matriz polimérica.

El documento D03 divulga un biosensor de acetilcolinesterasa desarrollado para detección de pesticidas. El sensor tiene un sistema de tres electrodos como en los documentos anteriores. En el electrodo de trabajo se incluye pasta de carbono con tetracianoquinodimetano (TCNQ) como mediador.

El documento D04 divulga la aplicación de polímeros conductores como biosensores, como por ejemplo el tiofeno. El interés de estos polímeros se encuentra en que pueden atrapar enzimas sobre electrodos.

El documento D05 divulga biosensores de poli(3,4-etilenedioxitiófeno)(PEDOT) y poli(pirrol) como el componente activo. Estos biosensores están basados en membranas y se utilizan para la medición de glucosa. Este documento divulga que el PEDOT es un politiofeno con gran estabilidad electroquímica y que no es necesario utilizar un mediador.

El documento D06 divulga un electrodo de enzimas constituido por una membrana conductora porosa en la que se deposita el polímero conductor en los poros de la misma y sobre el que se fijan las enzimas. Uno de los polímeros es el PEDOT.

Ninguno de los documentos citados divulga un sensor electroquímico para la detección de analitos en medios líquidos caracterizado porque comprende: una primera capa de material carbonoso, que constituye el sistema de electrodos compuesto por 3 electrodos; una segunda capa metálica depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo; una tercera capa aislante y una cuarta capa que comprende politiofeno y gel polimérico depositada sobre el extremo inferior del electrodo de trabajo.

El sensor de la invención, recogido en la reivindicación 1, se diferencia de los divulgados en los documentos D01 a D03, en dos aspectos, principalmente. En primer lugar, en el sensor de la invención, la capa que define el sistema de electrodos es una capa de carbono. En segundo lugar, el componente activo del electrodo de trabajo en los documentos D01 a D03 es CoPh o TCNQ, siendo la única función del polímero la de fijar las enzimas al electrodo. Sin embargo, en el sensor de la invención la capa polimérica está formada por un polímero conductor que actúa como componente activo y como fijador de enzimas. No sería obvio para el experto en la materia, llegar al sensor de la invención a partir del estado de la técnica mencionado.

Por lo tanto, el objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1 a 16 es nuevo y tiene actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).