

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 406**

21 Número de solicitud: 202031280

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/30 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.06.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

24.08.2023

Fecha de concesión:

07.03.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.03.2024

73 Titular/es:

BIOQUOCHEM S.L. (100.0%)

Edificio CEEI. Planta 3. Parque Tecnológico de Asturias

33428 Llanera (Asturias) ES

72 Inventor/es:

HEVIA SÁNCHEZ, David;

MUÑOZ CIMADEVILLA, Henar y

DÍAZ GONZÁLEZ, María

74 Agente/Representante:

DE DIOS SERRANÍA, Gustavo Adolfo

54 Título: **MÉTODO PARA MEDIR UNA CONCENTRACIÓN DE UN COMPUESTO DE ANÁLISIS O UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UNA MUESTRA COMPLEJA MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO DE FORMA SELECTIVA**

57 Resumen:

La invención proporciona un método para la medida de la concentración de un compuesto de análisis en una muestra original. El método comprende situar un primer compuesto (1, 6) en un primer transductor electroquímico (2), medir una primera concentración mediante la aplicación de un potencial en el transductor electroquímico (2), mezclar el primer compuesto con un segundo compuesto, situar la muestra modificada (5) en un segundo transductor electroquímico (2) y medir una segunda concentración mediante la aplicación de un potencial en el transductor electroquímico. El primer o el segundo compuesto es una parte de la muestra original (1). Por último, se realiza una operación entre la primera y la segunda concentración para obtener la concentración del compuesto de análisis en la muestra original.

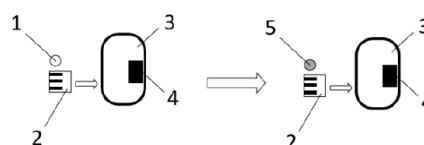


Fig. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 915 406 B2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA MEDIR UNA CONCENTRACIÓN DE UN COMPUESTO DE ANÁLISIS O UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UNA MUESTRA COMPLEJA MEDIANTE LA 5 CUANTIFICACIÓN DE PEROXIDO DE HIDROGENO DE FORMA SELECTIVA

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente patente se encuentra enmarcada dentro de los métodos analíticos de medición de moléculas o actividades enzimáticas en muestras complejas mediante la medida selectiva de concentración de peróxido de hidrógeno.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La medida de la concentración de una determinada sustancia puede ser en ocasiones útil para evaluar el comportamiento de dicha sustancia ante determinadas acciones.

Un ejemplo es el peróxido de hidrógeno, utilizado en la industria química, alimentaria, etc. Debido a su uso tan extendido, es muy útil contar con métodos que permitan conocer su
20 concentración en una muestra.

Existen asimismo muchos otros compuestos de los que la medición de su concentración resulta ventajosa.

25 Se conocen algunos métodos destinados a medir concentraciones de compuestos dentro de una muestra.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es uno de los más importantes sustratos en diversas reacciones biológicas catalizadas por oxidasas multifuncionales. El H_2O_2 posee varias
30 propiedades importantes como como propiedad oxidante, fuente de energía, formación de gas en descomposición, fuente de radicales libres, efectos sobre procesos biológicos y su uso en síntesis química. Dependiente en el índice de exposición ($> 10\%$), H_2O_2 es un irritante para la piel, ojo, tracto gastrointestinal, cerebro y mucosas.

35 La determinación precisa de H_2O_2 es muy importante en los campos de biológico, farmacéutico, clínico y ciencias ambientales, procesamiento de alimentos y textiles. En

áreas industriales y médicas, se utiliza para el tratamiento, blanqueo y esterilización de aguas residuales. Además de su papel en la citotoxicidad de la célula y en su status redox, el H₂O₂ juega un papel clave. como mensajero secundario, modulador vital y complejo vías biológicas, como el crecimiento celular, diferenciación celular, apoptosis, remodelación vascular, activación inmunitaria, movimiento estomático y crecimiento radicular. Niveles elevados de H₂O₂ han sido implicados en enfermedad que incluyen cáncer, artritis, diabetes, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, asma, enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el estrés oxidativo.

La detección de H₂O₂ sienta las bases para muchas técnicas analíticas y kits de prueba comerciales, como colorimetría, fluorimetría, espectrofotometría, quimioluminiscencia y método electroquímico. El principal inconveniente, es que los análisis consumen mucho tiempo, son caros, y sobretodo requieren tratamientos previos prolongados para la preparación de las muestras, utilización de costosos reactivo e interferencia.

En electroquímica, H₂O₂ puede ser directamente reducido / oxidado sobre superficies sólidas de electrodos. La detección de H₂O₂ con electrodos de metales nobles convencionales es restringido principalmente por las interferencias de otras especies electroactivas coexistentes en las muestras reales. En numerosas investigaciones la detección de H₂O₂ se centró principalmente en las modificaciones de los electrodos para resolver el problema de la baja sensibilidad y los sobrepotenciales elevados. Para fabricar selectivo biosensor de H₂O₂, se han utilizado nanopartículas de platino, polímeros redox, metal óxidos, nanofibras, nanotubos de carbono, una gran cantidad de nanomateriales avanzados como nanohíbridos de ácido carboxílico, fluoróforos, cápsulas de grafeno, óxido de grafeno reducido. Se han llegado a utilizar electrodos de ortosilicato de tetraetilo, polidimetilsiloxano y disco de grafito modificado con TTF.

Sin embargo, en todos los métodos hasta el momento tienen el mismo problema cuando se enfrentan a muestras complejas, que son las interferencias presentes en el momento que se intenta analizar H₂O₂ en muestras complejas como puede ser fluidos biológicos. En la presente invención pretendemos mostrar un método que permite solventar esas interferencias para obtener una medición del H₂O₂ de forma selectiva y que esta medida permita cuantificar otras moléculas y/o actividades enzimáticas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una solución alternativa al problema anteriormente
propuesto mediante un método de medida de parámetros de oxidación de acuerdo a la
5 reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes definen realizaciones preferidas de la
invención.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos (tanto los científicos como los
técnicos) que se usan en este documento han de ser interpretados como lo haría un
10 experto en la materia. Se entenderá, por tanto, que los términos de uso común deben ser
interpretados de la manera que lo haría un conocedor de la materia, y no de un modo
idealizado o estrictamente formal.

A lo largo del texto, la palabra “comprende” (y sus derivados, como “comprendiendo”) no
15 deben ser entendidos de un modo excluyente, sino que deben ser entendidos en el sentido
en que admiten la posibilidad de que lo definido pueda incluir elementos o etapas
adicionales.

Un objeto de la presente invención se refiere, aunque sin limitación, a un método para
20 medir una concentración de un compuesto de análisis en una muestra original,
comprendiendo el método las etapas de

situar un primer compuesto en un primer transductor electroquímico que contienen
un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia o pseudo-referencia y un electrodo
auxiliar;

25 medir una primera concentración mediante la aplicación de un potencial en el
transductor electroquímico;

mezclar el primer compuesto con un segundo compuesto, donde el primer o el
segundo compuesto es una parte de la muestra original, obteniendo una muestra
modificada, donde la muestra modificada tiene una concentración de compuesto de
30 análisis diferente a la de la muestra original, debido a la acción entre el primer compuesto
y el segundo compuesto;

situar la muestra modificada en un segundo transductor electroquímico que
contienen un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia o pseudo-referencia y un
electrodo auxiliar;

35 medir una segunda concentración mediante la aplicación de un potencial en el
transductor electroquímico;

realizar una operación entre la primera y la segunda concentración para obtener la concentración del compuesto de análisis en la muestra original.

De este modo, mediante una simple operación, es posible calcular la concentración de un compuesto de análisis dentro de una muestra original. La mezcla entre el primer y el segundo compuesto, uno de los cuales es la muestra a analizar, modifica la concentración del compuesto de análisis en la muestra. De este modo, es posible calcular, por diferencia, aquellos valores que se pretenden calcular, sin que la presencia de otros compuestos, tan habitual en líquidos biológicos, interfiera en dicha medición.

La mezcla del primer compuesto con el segundo compuesto se puede realizar utilizando la misma porción de primer compuesto que intervino en la primera medida o una porción distinta, en función de la variante del método y de los resultados que se quieran obtener.

Con una única medida no se obtiene toda la información necesaria para calcular la concentración del compuesto a analizar, debido a que la señal está afectada por la reacción de la multitud de compuestos que pueden estar contenidos en la muestra. Sin embargo, realizando medidas selectivas y operando con ellas, de acuerdo con el método de la invención, es posible obtener la medida deseada.

Gracias a este método es posible detectar concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 100 nM a 100mM, lo que es un rango muy amplio, ya que los métodos habituales apenas suelen cubrir dos órdenes de magnitud.

En realizaciones particulares, la etapa de medir la primera o la segunda concentración comprende

aplicar mediante un potencióstato una tensión al electrodo de trabajo según un método de amperometría, estando dicha tensión comprendida dentro del intervalo entre 0,35 y 0,45 V

obtener una media de varias medidas de intensidad de corriente obtenidas en un intervalo de tiempo.

La amperometría es un ejemplo particular que permite una medida rápida, sencilla y económica en ese rango de tensiones. No obstante, otro tipo de técnicas electroquímicas, como la voltametría de onda cuadrada, junto con otros rangos de tensión, permiten obtener resultados semejantes.

Este ejemplo particular, en el que se obtiene la media de varias medidas de intensidad de corriente, permite disminuir la variabilidad de las medidas, atenuando cualquier medida inusual que se pueda obtener debido a alteraciones momentáneas del sistema (un golpe en el aparato, una interferencia electromagnética de un aparato cercano, una sacudida, etc).

En realizaciones particulares, el intervalo de tiempo está comprendido en el rango entre 20 y 40 segundos, concretamente entre 25 y 30 segundos.

El método de la invención permite calcular los datos relevantes en menos de 40 segundos. El intervalo entre 25 y 30 segundos es particularmente ventajoso, ya que ofrece un equilibrio entre una medida suficientemente temprana (aprovechando el nivel alto de la señal) pero suficientemente alejada del principio del tiempo para desestimar cualquier efecto transitorio.

En realizaciones particulares, el primer compuesto es la muestra original y el segundo compuesto es una enzima. En realizaciones particulares, la enzima es una peroxidasa, como por ejemplo, la catalasa.

Las enzimas peroxidasas, como la catalasa, eliminan rápidamente el peróxido de hidrógeno, permitiendo obtener un valor de referencia cero en la muestra modificada. No obstante, se entiende que, cuando el compuesto a medir es otro diferente, cualquier enzima que selectivamente y eficientemente degrade dicho compuesto que pueda haber sido medido por técnica electroquímica entra dentro del alcance de la invención, ya que su uso encaja perfectamente en la metodología definida.

En realizaciones particulares, el primer compuesto comprende una concentración del compuesto de análisis y el segundo compuesto es la muestra original.

Se puede ajustar a voluntad la concentración del compuesto de análisis, para optimizar los resultados de medición. En este caso, la primera medición corresponderá con la medida de una concentración conocida del compuesto de análisis, mientras que la segunda medida corresponderá con la suma de la concentración conocida y la concentración de la muestra original.

En realizaciones particulares, el compuesto de análisis es peróxido de hidrógeno.

Como se ha indicado anteriormente, es un compuesto presente en muchas aplicaciones, por lo que la medida de su concentración puede resultar muy útil. Además, la medida
5 obtenida también puede utilizarse para cuantificar la actividad enzimática, por ejemplo, de las peroxidasas. Si además se utilizan inhibidores selectivos, se podrían considerar distintos tipos de enzimas.

En realizaciones particulares, el transductor electroquímico es una tira fungible y
10 comprende un electrodo de trabajo, un electrodo de pseudo-referencia y un electrodo auxiliar hechos de carbono modificados con Co- Phthalocyanine.

El uso de este electrodo permite obtener una señal incrementada, que filtra el ruido proveniente de una gran cantidad de compuestos. De este modo, la medida resulta de
15 especial utilidad para medir la concentración de algunos compuestos, como el peróxido de hidrógeno o los tioles.

Además, el método de la invención posibilita la deposición de la muestra modificada en una tira fungible. De este modo, sería un dispositivo portátil el encargado de realizar las
20 etapas de aplicar la tensión a la muestra y de calcular la primera y segunda concentraciones.

En realizaciones particulares, el segundo transductor es el primer transductor después de haber sido limpiado.
25

Existe la opción de utilizar dos transductores distintos o de limpiar el primero para volverlo a utilizar en la segunda medida. La preferencia por una u otra opción dependerá de los medios disponibles en cada caso.

30 En realizaciones particulares, después de mezclar el primer compuesto con el segundo compuesto, el método comprende la etapa adicional de dejar incubar la muestra modificada al menos 5 segundos.

De este modo, se mejora la calidad de la medida, asegurando la homogeneidad de la
35 mezcla.

En realizaciones particulares, la muestra original tiene un volumen comprendido entre 25 y 55 μl .

Este volumen es adecuado para asegurar una medición óptima.

5

En realizaciones particulares, el método incluye una etapa preliminar de transformación de la muestra original, en la que se elige un compuesto inicial de análisis y se transforma dicho compuesto inicial de análisis en otro compuesto, que hará las veces de compuesto de análisis en las etapas restantes del método.

10

Lo que quiere decir esta etapa es que, aunque el método esté optimizado para medir la concentración de un determinado compuesto de análisis, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno, existe la posibilidad de medir la concentración de otros compuestos.

15

Por ejemplo, se dispone de una muestra original en la que se quiere medir el contenido de glucosa (el compuesto inicial de análisis). Para ello, se realiza esta etapa previa de transformar toda la glucosa en peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno es el que hace las veces de compuesto de análisis en las etapas restantes del método. De este modo, las etapas del método permiten calcular la concentración del compuesto de análisis (i.e., peróxido de hidrógeno), lo cual permite obtener la concentración que el compuesto inicial de análisis (i.e., glucosa) tenía en la muestra original antes de la etapa preliminar de transformación.

20

En un aspecto inventivo adicional, la invención se refiere a un aparato de medida que comprende medios para llevar a cabo las etapas de un método de acuerdo con el primer aspecto inventivo.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

A continuación, se presenta una descripción breve de cada una de las figuras usadas para completar la descripción de la invención que sigue. Dichas figuras se relacionan con el estado de la técnica o con realizaciones preferentes de la invención, que se presentan como ejemplos no limitativos de la misma.

35

La Figura 1 muestra las etapas de un primer método de acuerdo con la invención.

La figura 2 muestra la evolución gráfica de la intensidad en nanoamperios con respecto al tiempo en mediciones realizadas en un método de acuerdo con la invención.

- 5 La figura 3 muestra la relación entre la intensidad diferencial y la concentración de peróxido de hidrógeno en un método de acuerdo con la invención.

La Figura 4 muestra las etapas de un segundo método de acuerdo con la invención.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se procede a continuación a describir un ejemplo de realización preferida de la presente invención, aportada con fines ilustrativos pero no limitativos de la misma.

15

La figura 1 muestra las etapas de un primer método de acuerdo con la invención.

En este primer método, se parte de una muestra alimenticia original 1, de la cual se desea obtener la concentración de peróxido de hidrógeno.

20

Para ello, se sitúan 50 µl de la muestra original 1 en una tira fungible 2 que tiene tres electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de pseudo-referencia y un electrodo auxiliar hechos de carbono modificados con Co- Phthalocyanine.

25

Una vez situada la muestra, se introduce la tira fungible 2 en un dispositivo portátil de medida 3 donde se aplica, mediante un potenciómetro 4, una tensión de 0,4 V al electrodo de trabajo según un método de amperometría. En este proceso, se obtiene la media de la intensidad de corriente obtenida entre los 25 y los 30 segundos.

30

A continuación, se toman otros 50 µl de la muestra original 1, a los que se le añade una disolución de catalasa 7. La mezcla 5 se deja incubar un minuto y se sitúa sobre una segunda tira fungible 2 igual que la primera, se vuelve introducir en el dispositivo portátil de medida 3 y se realiza nuevamente una amperometría en los mismos términos que la anterior, obteniendo un segundo valor que es la media de la intensidad de corriente

35

obtenida entre los 25 y los 30 segundos.

La diferencia en nA entre la intensidad media obtenida en la primera medida y la intensidad media obtenida en la segunda medida es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno en la muestra original, debido a que la diferencia entre la primera y la segunda muestra es la acción de la catalasa, que ha eliminado la concentración de peróxido de hidrógeno de la muestra.

De este modo, al realizar una segunda amperometría en los mismos términos que la primera, la diferencia será debida únicamente a la diferencia en la concentración de peróxido de hidrógeno entre ambas muestras, que es justamente lo que se desea medir. Teniendo en cuenta que, en la segunda muestra, la concentración es cero, ya que ha sido eliminado por la catalasa, la diferencia de concentración proporcionará la concentración de peróxido de hidrógeno en la muestra original sin modificar.

Como resultará evidente para el experto en la materia, este método puede reproducirse utilizando otra enzima distinta para medir la concentración de otro compuesto distinto, siempre y cuando la enzima sea adecuada para degradar de manera selectiva y eficaz dicho compuesto cuya concentración se desea medir.

La figura 2 muestra la evolución gráfica de la intensidad en nanoamperios con respecto al tiempo en cada una de las dos mediciones.

En la línea superior de la gráfica, representada en línea oscura, se representa la evolución de la intensidad con respecto al tiempo en la primera medición, realizada sobre la muestra original con la concentración de peróxido de hidrógeno que se desea medir.

En esta evolución se han realizado varias medidas entre 25 y 30 segundos, obteniendo un valor medio de intensidad de 0,2736 mA.

Este valor por sí solo no permite calcular la concentración de peróxido de hidrógeno, ya que la forma de la intensidad puede ser debida a muchos y muy diferentes compuestos.

La línea inferior de la gráfica, representada en línea más clara, muestra la evolución de la intensidad con el tiempo en la segunda medición, realizada sobre la mezcla de la muestra original y catalasa, una vez que se ha dejado reposar.

En esta evolución se han realizado varias medidas entre 25 y 30 segundos, obteniendo un valor medio de intensidad de 0,1600 mA.

La diferencia entre ambos valores medios da una intensidad diferencial de 0,1136 mA.

5

La figura 3 muestra la relación entre esta intensidad diferencial y la concentración de peróxido de hidrógeno eliminado. Como puede observarse, la relación es prácticamente lineal, por lo que la intensidad diferencial, obtenida como la diferencia entre la media de las medidas antes de aplicar la catalasa y la media de las medidas después de aplicar la catalasa, permite deducir de manera sencilla la concentración de peróxido de hidrógeno en la muestra original.

10

Existe una variante de este método. Por ejemplo, si lo que se desea medir en una muestra es la concentración de glucosa, se puede utilizar el método especialmente diseñado para el peróxido de hidrógeno simplemente con una etapa previa de transformar toda la glucosa en peróxido de hidrógeno.

15

De este modo, una vez realizada esa etapa previa, se tiene una muestra original alterada que tiene una concentración de peróxido de hidrógeno equivalente a la concentración de glucosa de la muestra original. Aplicando el método anteriormente descrito a la muestra original alterada, se obtendrá la concentración de peróxido de hidrógeno de la muestra original alterada, con lo cual se puede deducir fácilmente la concentración de glucosa de la muestra original.

20

La figura 4 muestra las etapas de un segundo método de acuerdo con la invención.

25

En este caso, se utiliza una variante del método anterior. Aquí también se dispone de una muestra original alimenticia cuya concentración de peróxido de hidrógeno se desea medir.

Sin embargo, en este caso, la primera etapa comprende situar en la tira fungible 2 una disolución 6 con una concentración conocida de peróxido de hidrógeno. Al realizar la amperometría en los mismos términos que en el ejemplo anterior, se obtiene una primera medida de la media de la intensidad obtenida entre los 25 y los 30 segundos.

30

La siguiente etapa consiste en mezclar la muestra original 1 con la primera disolución 6 y realizar de nuevo la amperometría sobre la mezcla resultante 8.

35

En este caso, la segunda medida obtenida se referirá a una mezcla en la que la concentración de peróxido de hidrógeno será la suma entre la concentración conocida de la primera disolución y la concentración de la muestra cuya concentración se desea conocer (corregida obviamente por el aumento de volumen de la mezcla).

5

Por lo tanto, al realizar la segunda amperometría, es sencillo, mediante una operación de diferencia de intensidades medias, obtener la concentración de peróxido de hidrógeno de la muestra original.

REIVINDICACIONES

1.- Método para medir una concentración de un compuesto de análisis en una muestra original, comprendiendo el método las etapas de

5 situar un primer compuesto (1, 6) en un primer transductor electroquímico (2) que contienen un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia o pseudo-referencia y un electrodo auxiliar;

 medir una primera concentración mediante la aplicación de un potencial en el transductor electroquímico (2);

10 mezclar el primer compuesto (1, 6) con un segundo compuesto (1, 7), donde el primer o el segundo compuesto es una parte de la muestra original (1), obteniendo una muestra modificada (5, 8), donde la muestra modificada (5, 8) tiene una concentración de compuesto de análisis diferente a la de la muestra original debido a la acción entre el primer compuesto y el segundo compuesto;

15 situar la muestra modificada en un segundo transductor electroquímico (2) que contienen un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia o pseudo-referencia y un electrodo auxiliar;

 medir una segunda concentración mediante la aplicación de un potencial en el transductor electroquímico (2);

20 realizar una operación entre la primera y la segunda concentración para obtener la concentración del compuesto de análisis en la muestra original

 caracterizado el método porque

 o bien el primer compuesto es la muestra original y el segundo compuesto es catalasa,

25 o bien el primer compuesto comprende una concentración de peróxido de hidrógeno (6) y el segundo compuesto es la muestra original (1).

2.- Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de medir la primera o la segunda concentración comprende

30 aplicar mediante un potencióstato (4) una tensión al electrodo de trabajo según un método de amperometría, estando dicha tensión comprendida dentro del intervalo entre 0,35 y 0,45 V

 obtener una media de varias medidas de intensidad de corriente obtenidas en un intervalo de tiempo.

35

3.- Método según la reivindicación 2, en el que el intervalo de tiempo está comprendido en el rango entre 20 y 40 segundos, concretamente entre 25 y 30 segundos.

5 4.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el transductor electroquímico (2) es una tira fungible y comprende un electrodo de trabajo, un electrodo de pseudo-referencia y un electrodo auxiliar hechos de carbono modificados con Co-Phthalocyanine.

10 5.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo transductor es el primer transductor después de haber sido limpiado.

6.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, después de mezclar el primer compuesto con el segundo compuesto, el método comprende la etapa adicional de dejar incubar la muestra modificada (5, 8) al menos 5 segundos.

15

7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra original (1) tiene un volumen comprendido entre 25 y 55 μ l.

20 8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye una etapa preliminar de transformación de la mezcla original, en la que se elige un compuesto inicial de análisis y se transforma dicho compuesto inicial de análisis en otro compuesto, que hará las veces de compuesto de análisis en las etapas restantes del método.

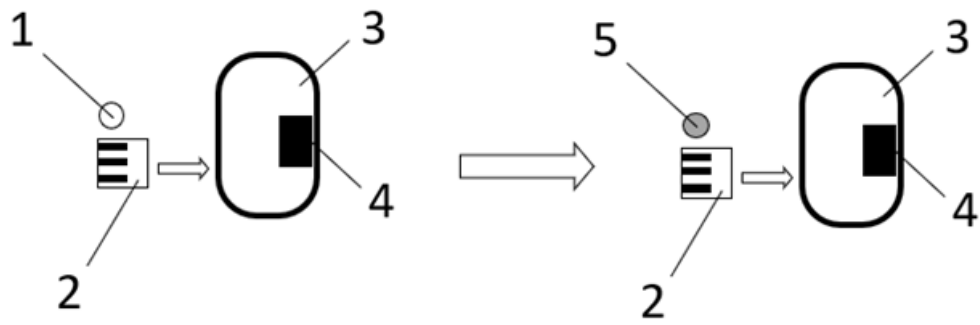


Fig. 1

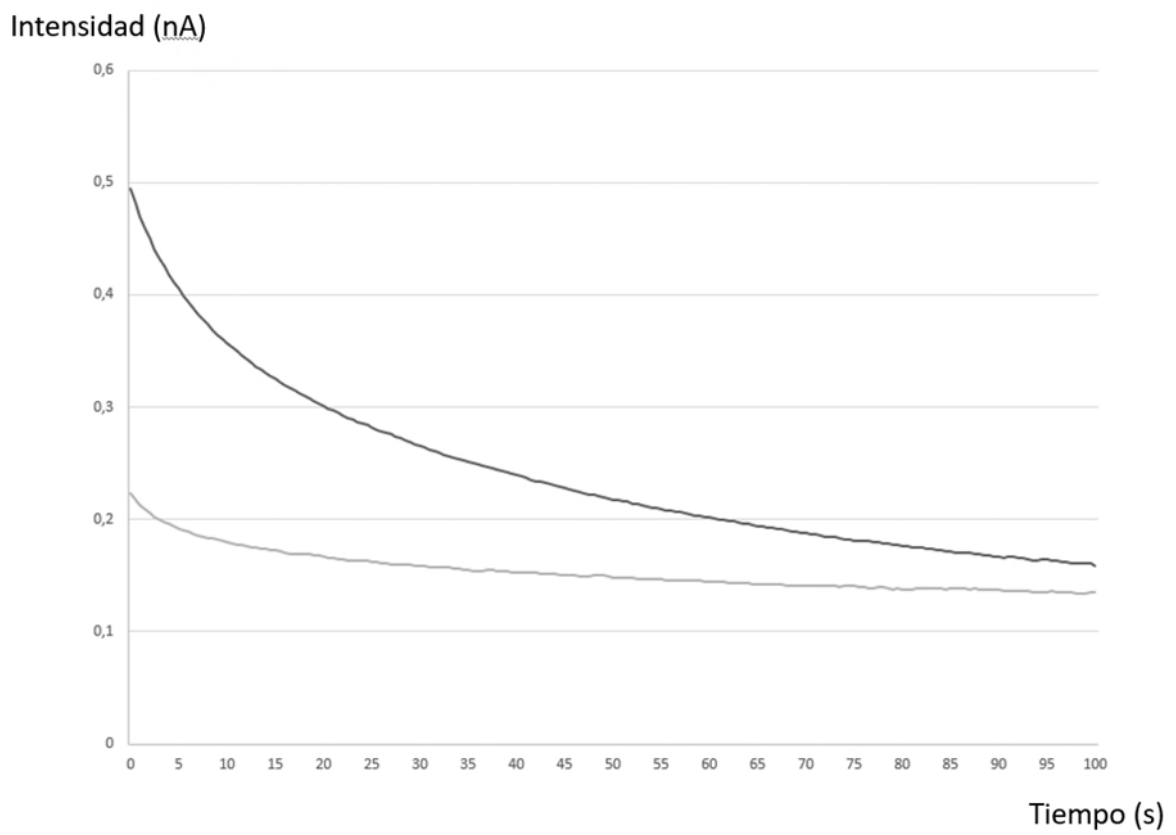
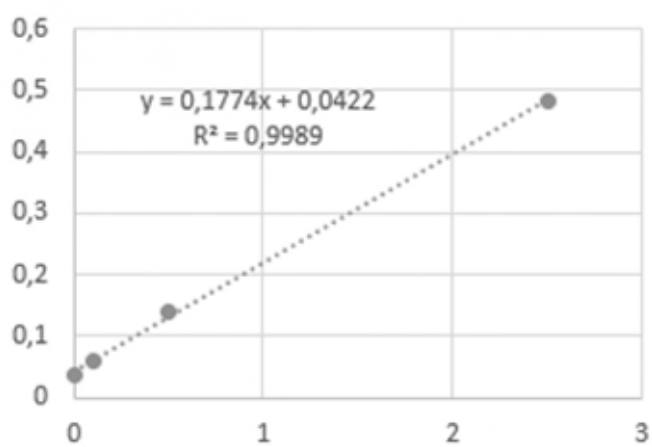


Fig. 2

Δ Intensidad (nA)



Concentración H₂O₂ (μM)

Fig. 3

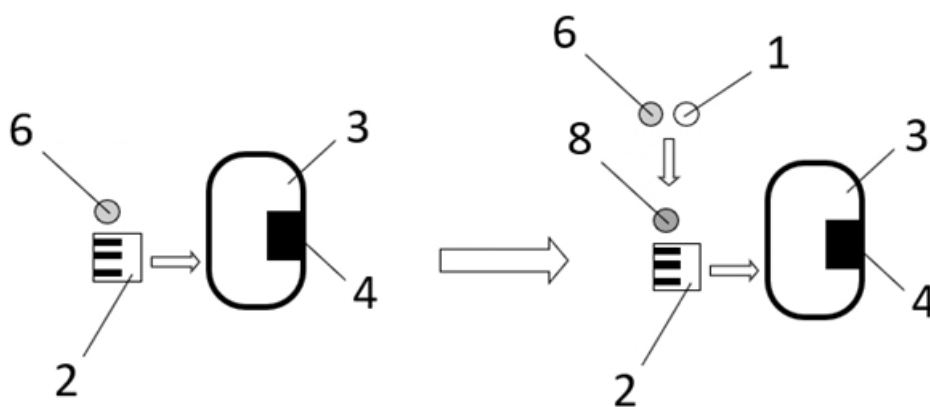


Fig. 4