

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 313**

51 Int. Cl.:

**C23C 18/16** (2006.01)

**C23C 18/12** (2006.01)

**A61B 5/00** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/54** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07122884 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1935331**

54 Título: **Proceso para la preparación de electrodos modificados, electrodos preparados con dicho proceso, y biosensores enzimáticos que comprenden dichos electrodos**

30 Prioridad:

**13.12.2006 IT FI20060322**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.12.2015**

73 Titular/es:

**A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE  
RIUNITE S.R.L. (100.0%)  
Via Sette Santi 3  
50131 Firenze, IT**

72 Inventor/es:

**PALLESCHI, GIUSEPPE;  
RICCI, FRANCESCO;  
MOSCONI, DANILA y  
POSCIA, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

**RUO, Alessandro**

ES 2 555 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de electrodos modificados, electrodos preparados con dicho proceso, y biosensores enzimáticos que comprenden dichos electrodos

5

**Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de electrodos modificados para la medición de analitos en fluidos biológicos, y en particular a un nuevo proceso para la preparación de electrodos modificados con azul de Prusia, electrodos modificados preparados como se describe, biosensores que comprenden dichos electrodos y al método para la determinación de analitos en fluidos biológicos usando dichos electrodos.

10

**Estado de la técnica**

**[0002]** El uso del azul de Prusia para modificar electrodos enzimáticos amperométricos se conoce desde hace tiempo, y fue el resultado del descubrimiento en la década de los 80 de que el azul de Prusia se puede depositar en capas sobre electrodos de diferentes materiales tales como el platino, carbono vítreo, SnO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>, y tiene un efecto catalítico en la reducción del peróxido de hidrógeno producido durante la oxidación enzimática del analito.

15

**[0003]** Con dichos electrodos modificados con azul de Prusia se puede identificar la concentración de peróxido de hidrógeno formado, permitiendo así la medición indirecta de la concentración del analito oxidado, que es directamente proporcional a la cantidad de peróxido de hidrógeno producido.

20

**[0004]** Por tanto estos electrodos modificados con azul de Prusia se han usado para aplicaciones analíticas, en particular en biosensores amperométricos para la medición de los niveles de glucosa en sangre. Además de actuar como mediador electroquímico en la reducción del peróxido de hidrógeno, la capa de azul de Prusia también se puede usar como sustrato para la inmovilización de la enzima oxidasa.

25

**[0005]** Los electrodos modificados con azul de Prusia se pueden preparar, por ejemplo, por medio de deposición electroquímica de soluciones de ferrocianuro férrico sobre un electrodo constituido por uno de los materiales anteriormente mencionados. La patente de Estados Unidos n.º 5.876.581, por ejemplo, describe un proceso de deposición electroquímica en el que se sumergen un par de electrodos en una solución que contiene los iones hierro (II) y hexacianoferrato (III); realizando la electrólisis con uno de los dos electrodos como cátodo y el otro como ánodo, se deposita una capa de hexacianoferrato férrico (III), conocido como azul de Prusia, sobre la superficie del cátodo.

30

35

**[0006]** Los electrodos que se pueden usar en este proceso de acuerdo con el documento de Estados Unidos 5.876.581 requieren la presencia de un cátodo fabricado o revestido con un metal inerte tal como platino, rodio, oro, etc., o un óxido de un metal conductor o semiconductor.

40

**[0007]** Más recientemente, estos electrodos tradicionales han sido sustituidos por electrodos serigrafiados (SPE), que tienen numerosas ventajas: son baratos, fáciles de preparar, son versátiles y adecuados para su producción a escala industrial.

45

**[0008]** Como se ha mencionado anteriormente, los electrodos modificados con azul de Prusia se llevan usando desde hace algún tiempo, depositando este producto sobre la superficie del electrodo por medio de técnicas electroquímicas. Dichas técnicas, no obstante, no son adecuadas para la producción a gran escala de electrodos modificados partiendo de electrodos serigrafiados por dos razones principales: 1) los procedimientos electroquímicos en general son largos, y se han de realizar electrodo por electrodo, con una enorme pérdida de tiempo en caso de preparación de un gran número de electrodos; y 2) la forma plana de los electrodos serigrafiados hace difícil y laborioso el uso de procedimientos electroquímicos puesto que estos últimos requieren la inmersión del electrodo en la solución que contiene especies iónicas, y esto puede dar lugar a la formación de una capa de azul de Prusia también sobre la superficie del electrodo de referencia, obstruyendo la conductividad eléctrica e impidiendo el uso del electrodo serigrafiado para fines analíticos.

50

55

**[0009]** Por estas razones, hasta donde sabe el solicitante, actualmente no existen procedimientos electroquímicos para la deposición de azul de Prusia sobre electrodos serigrafiados. Un proceso para la deposición química de azul de Prusia sobre un electrodo serigrafiado se describe por Ricci et al. en Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) 165-174. Dicho proceso comprende, antes de la deposición química del azul de Prusia, el pretratamiento electroquímico de los electrodos, que son tratados electroquímicamente durante 3 minutos a un potencial de 1,7 V. Según este artículo, dicho procedimiento es esencial para obtener una reproducibilidad y una respuesta mejoradas del electrodo, pero por otra parte hace que la producción de los electrodos modificados sea muy laboriosa, al requerir un pretratamiento electroquímico para cada uno de ellos y anulando con ello las ventajas de la deposición química.

60

65

[0010] En el proceso descrito en el artículo anterior, además, el azul de Prusia se deposita sobre el electrodo manualmente, por medio de un procedimiento complicado que requiere una gran precaución para impedir un incremento en la resistencia interna del sistema: se debe preparar una mezcla *in situ*, añadiendo una solución de ferricianuro de potasio en HCl a una solución de cloruro férrico en HCl, tras lo cual se deposita exclusivamente una gota de dicha mezcla sobre la superficie del electrodo de trabajo, intentando evitar el electrodo de referencia y el contra-electrodo.

[0011] Incluso con las precauciones anteriores, los electrodos modificados de esta manera están limitados en términos de reproducibilidad de la deposición y estabilidad de la capa de azul de Prusia; por lo tanto, incluso aunque los electrodos serigrafiados se caracterizan *per se* por un alto nivel de reproducibilidad de la superficie del electrodo, responsable de la estabilidad y reproducibilidad de la señal eléctrica del analito, la mala reproducibilidad y la falta de uniformidad en la preparación de la capa de azul de Prusia generan graves problemas en la medición de la cantidad de analitos en fluidos biológicos, y en general en las aplicaciones para las que está destinado el electrodo.

[0012] Dada las ventajas asociadas al uso de electrodos serigrafiados, es evidente que existe una gran necesidad en el sector de un proceso fácilmente escalable, mediante el cual se pueda modificar la superficie de electrodos serigrafiados con azul de Prusia, superando los inconvenientes señalados anteriormente de los procesos conocidos.

### Sumario de la invención

[0013] El solicitante ha desarrollado un nuevo proceso, particularmente barato y simple de producir, que permite la modificación de electrodos serigrafiados con azul de Prusia, obteniendo electrodos con un alto nivel de estabilidad y reproducibilidad, útiles en la producción de biosensores planos para la determinación cuantitativa de analitos en fluidos biológicos.

[0014] El objeto de la presente invención por tanto es un proceso para la preparación de un electrodo serigrafiado modificado con azul de Prusia de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la deposición secuencial sobre la superficie de dicho electrodo serigrafiado de una solución que comprende ión hierro (III) o hierro (II) y al menos un agente superficialmente activo en un disolvente adecuado y una solución que comprende el ión ferrocianuro (II) o ferricianuro (III) y al menos un agente superficialmente activo en un disolvente adecuado, dichas soluciones que tienen concentraciones tales que se obtiene directamente la formación de azul de Prusia sobre la superficie del electrodo.

[0015] El electrodo serigrafiado modificado con azul de Prusia de acuerdo con la reivindicación 16 preparado por medio del proceso anteriormente mencionado, el electrodo enzimático de acuerdo con la reivindicación 17 y el biosensor enzimático de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende dicho electrodo, y un método para la determinación de la cantidad de analito en una muestra biológica de acuerdo con la reivindicación 21 que comprende el contacto entre dicha muestra y el biosensor enzimático anteriormente mencionado constituyen un objeto adicional de la invención.

[0016] En la siguiente descripción se ilustran con detalle características y ventajas de la invención.

### Breve descripción de las figuras

[0017]

Figura 1: Perfil del electrodo serigrafiado modificado preparado como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 2: Voltamograma cíclico registrado usando el electrodo serigrafiado modificado como se describe en el Ejemplo 1 (curva a), y voltamograma cíclico registrado con el mismo electrodo en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (curva b), que muestra la actividad electrocatalítica del azul de Prusia.

Figura 3: Voltamograma cíclico registrado usando el electrodo serigrafiado modificado como se describe en el Ejemplo 3 para su comparación (curva a), y voltamograma cíclico registrado con el mismo electrodo en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (curva b), que muestra la actividad electrocatalítica del azul de Prusia.

Figura 4: Comparación entre el voltamograma cíclico registrado usando el electrodo modificado como se describe en el Ejemplo 1 (curva a) y el voltamograma registrado con el electrodo modificado como se describe en el Ejemplo 3 para su comparación (curva b). Nótese la mayor deposición de azul de Prusia obtenida con el electrodo del Ejemplo 1.

Figura 5: Comparación entre la estabilidad operativa de un electrodo modificado de acuerdo con el Ejemplo 1 (Figura 5 a) y un electrodo modificado de acuerdo con el Ejemplo 3 para su comparación (Figura 5b), a partir de la cual se puede apreciar la mayor estabilidad operativa del electrodo obtenido con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

### Descripción detallada de la invención

[0018] La solución que contiene el ión hierro (III) o hierro (II) usada en el proceso de la invención es, por ejemplo, una solución ácida con un pH entre 0,5 y 6,0, preferentemente una solución ácida obtenida mediante la adición de

HCl, de un compuesto seleccionado del grupo constituido por sales de hierro (III) o hierro (II) de ácidos inorgánicos, por ejemplo, cloruro férrico, sulfato férrico o nitrato férrico; preferentemente la presente solución es una solución de cloruro férrico en HCl acuoso 0,01 M que tiene un pH de 2,0.

5 **[0019]** La concentración del ión hierro (III) o hierro (II) en la solución anteriormente mencionada puede ser, por ejemplo, entre 20 mM y 2 M, y preferentemente es de 1 M.

10 **[0020]** La solución que contiene el ión hexacianoferrato (III) de acuerdo con la invención es, por ejemplo, una solución ácida con un pH entre 0,5 y 6,0, obtenida preferentemente mediante la adición de HCl, de una sal que contiene el ión ferrocianuro  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  o el ión ferricianuro  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , por ejemplo hexacianoferrato de sodio, de potasio, de amonio o de cobalto; preferentemente, la presente solución es una solución de ferricianuro de potasio  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en HCl acuoso 0,01 M que tiene un pH de 2,0.

15 **[0021]** La concentración del ión ferrocianuro (II) o ferricianuro (III) en la solución anteriormente mencionada puede ser, por ejemplo, entre 20 mM y 2 M, y preferentemente es de 1 M.

20 **[0022]** De acuerdo con la invención, el presente proceso comprende la deposición de la solución que contiene el ión hierro (III) o hierro (II) sobre la superficie del electrodo de trabajo e, inmediatamente después, la deposición de la solución que contiene el ión hexacianoferrato (III), en un volumen y concentración iguales.

**[0023]** El volumen de las dos soluciones con una concentración entre 20 mM y 2 mM se encuentra, por ejemplo, entre 100 nl y 4  $\mu\text{l}$  para una superficie del electrodo de entre 0,314  $\text{mm}^2$  y 3,14  $\text{cm}^2$ , preferentemente de 3,14  $\text{mm}^2$ .

25 **[0024]** Los electrodos serigrafiados sobre un material inerte, por ejemplo, policarbonato, poliéster, cloruro de polivinilo (PVC) u otro material plástico, con colorantes adecuados de materiales conductores, por ejemplo grafito, plata, oro o platino, son adecuados para su uso en el presente proceso para la preparación de los electrodos modificados de la invención; el colorante de grafito es preferible para el electrodo de trabajo.

30 **[0025]** Si es necesario, después de la mezcla de las dos soluciones, la mezcla se deja reposar durante un periodo, por ejemplo, de entre 2 minutos y 2 horas, y preferentemente de 10 minutos; a continuación la superficie del electrodo de trabajo se lava con una solución de lavado que consiste, por ejemplo, en una solución acuosa ácida con un pH entre 0,5 y 6,0, y preferentemente una solución acuosa de HCl 0,01 M que tiene un pH de 2,0.

35 **[0026]** Después de esto, el electrodo de trabajo se puede lavar adicionalmente con agua destilada.

**[0027]** Los electrodos modificados de esta manera a continuación se dejan secar en una estufa, por ejemplo, a una temperatura entre 50 °C y 200 °C durante un periodo de entre 10 minutos y 3 horas. Preferentemente, el electrodo se pone en una estufa a una temperatura de 100 °C durante 1 hora y 30 minutos.

40 **[0028]** Las dos soluciones que comprenden el ión hierro (III) o hierro (II) y el ión ferrocianuro (II) o ferricianuro (III) de acuerdo con la invención además comprenden al menos un agente superficialmente activo, seleccionado entre agentes superficialmente activos catiónicos, aniónicos, anfóteros y sus mezclas, en cantidades para cada solución, por ejemplo, de entre el 0,001 y el 10 % en peso con respecto al volumen total de la solución. Preferentemente, el agente superficialmente activo se selecciona del grupo constituido por laurilsulfato sódico y etoxisulfato de laurilo, cloruro de benzalconio, compuestos que pertenecen a la familia de productos conocidos con el nombre comercial Tween<sup>®</sup>, es decir, derivados de polioxietileno de ésteres de ácidos grasos con sorbitol, y sus mezclas.

50 **[0029]** De acuerdo con una realización particularmente preferida de la invención, el agente superficialmente activo monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, comercializado con el nombre Tween<sup>®</sup> 20 se añade a cada una de las dos soluciones que comprenden respectivamente el ión hierro (III) o hierro (II) y el ferrocianuro (II) o ferricianuro (III), en cantidades del 0,05 % en peso con respecto al volumen total de la solución.

55 **[0030]** Con el presente procedimiento de deposición, se puede obtener una capa de azul de Prusia sobre la superficie del electrodo de trabajo que es extremadamente reproducible y activo desde el punto de vista electroquímico. Por otra parte, con la técnica de voltametría cíclica, se ha determinado la cantidad de azul de Prusia presente sobre el electrodo de trabajo después de la deposición, identificando valores de entre 10 y 200  $\text{nmol}/\text{cm}^2$  y preferentemente de 100  $\text{nmol}/\text{cm}^2$ .

60 **[0031]** Con el presente proceso, por tanto, se puede obtener una deposición masiva de azul de Prusia, nunca observada hasta ahora ni con procesos químicos ni electroquímicos; la alta densidad superficial del azul de Prusia presente sobre la superficie del electrodo permite que se obtenga una estabilidad operativa extremadamente elevada sin afectar a la actividad catalítica del azul de Prusia con respecto a la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

65 **[0032]** Los electrodos modificados con azul de Prusia preparados con el proceso de la invención se pueden usar para la preparación de biosensores enzimáticos tanto con dos como con tres electrodos, que también son el objeto de la presente invención. En dichos biosensores, el electrodo modificado se usa como soporte para la inmovilización

de una enzima adecuada, seleccionada en base al tipo de determinación analítica para la cual está destinado el biosensor, es decir, tal que el analito a detectar funcione como sustrato para la enzima, generando un producto que se puede oxidar o reducir electroquímicamente sobre el electrodo modificado, variando la cantidad de corriente detectada en proporción a la cantidad de analito presente en el fluido analizado.

5 **[0033]** El presente biosensor comprende un electrodo enzimático, es decir, el electrodo modificado de la invención como se ha descrito anteriormente, sobre el que se ha inmovilizado la enzima por medio de procedimientos usados habitualmente y conocidos por cualquier experto en la materia, y una celda para recibir el fluido biológico a analizar, de manera que este último pueda entrar en contacto con la enzima.

10 **[0034]** De acuerdo con una realización preferida de la invención, el presente biosensor comprende un electrodo modificado de la invención sobre el que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa, y se usa para la determinación de glucosa en fluidos biológicos tales como la sangre, suero o plasma; en este caso, el analito es la glucosa que, oxidada por la enzima, produce  $H_2O_2$  que se reduce sobre el electrodo modificado debido al potencial aplicado entre este electrodo y el electrodo de referencia, generando una señal de corriente proporcional a la cantidad de  $H_2O_2$  producido y por tanto a la cantidad de glucosa presente en el fluido contenido en la celda.

15 **[0035]** Un objeto adicional de la invención es el método para la determinación de la cantidad de un analito en un fluido biológico, que comprende la aplicación de un valor de potencial apropiado entre un electrodo modificado de la invención como se ha descrito anteriormente y el electrodo de referencia contenido en el presente biosensor, y la lectura de la señal de corriente generada.

20 **[0036]** Preferentemente, el presente método se usa para la determinación de la cantidad de glucosa sobre fluidos biológicos y el potencial aplicado es bajo, por ejemplo, entre -250 mV y +200 mV, preferentemente de -50 mV.

25 **[0037]** El presente proceso para la preparación de electrodos modificados con azul de Prusia, como se ha descrito anteriormente, tiene un alto nivel de reproducibilidad de la fase de deposición, que afecta positivamente a la reproducibilidad de la medición realizada con los electrodos modificados mediante este proceso; por otra parte, proporciona un electrodo modificado con una mayor estabilidad operativa que cualquier electrodo modificado con azul de Prusia preparado hasta la fecha con los procesos conocidos. Se ha observado que en los electrodos modificados por medio del presente proceso, la capa de azul de Prusia aún se encuentra activa y presenta una reducción en su actividad electroquímica de solo el 35 % aproximadamente, después de 150 horas de uso continuo.

30 **[0038]** Además de una mayor estabilidad operativa, los electrodos modificados con azul de Prusia preparados con el proceso de la invención también presentan una mayor estabilidad a largo plazo durante su almacenamiento.

35 **[0039]** Estos valores de estabilidad, tanto operativos como de almacenamiento, y valores de reproducibilidad, en el caso de biosensores tanto con dos como con tres electrodos, se consiguen además mediante un proceso que no requiere, al contrario por ejemplo con el proceso descrito por Ricci et al. en Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) 165-174, de pretratamiento electroquímico del electrodo antes de la deposición del azul de Prusia, y por tanto es mucho menos laborioso y fácil de automatizar, y por tanto escalable a nivel industrial.

40 **[0040]** Una ventaja adicional de los electrodos modificados de la invención, en el caso de biosensores con dos electrodos que se pueden usar, por ejemplo, para la determinación de glucosa, es que comprenden un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, aunque no requieren el contra-electrodo, al contrario, por ejemplo, que los electrodos modificados con azul de Prusia descritos en el artículo de Ricci et al. anteriormente mencionado.

45 **[0041]** Los siguientes ejemplos proporcionan una ilustración no limitante de la invención.

#### 50 Ejemplo 1

##### Preparación del electrodo modificado

55 **[0042]** Siguiendo el procedimiento conocido, se preparó un electrodo serigrafiado sobre una lámina de poliéster, que comprende un electrodo de trabajo con forma circular con un diámetro de 2 mm preparado con un colorante de grafito y un electrodo de referencia de plata; la superficie del electrodo de trabajo está delimitada por un colorante fabricado de un material aislante. La Figura 1 muestra el perfil del electrodo obtenido de esta manera.

60 **[0043]** A continuación se prepararon las siguientes dos soluciones: 1) solución de 1 M de ferricianuro de potasio  $K_3Fe(CN)_6$  en HCl 10 mM y 2) solución de cloruro férrico 1 M en HCl 10 mM. Se añadió Tween<sup>®</sup> 20 a cada una de las dos soluciones en una cantidad del 0,05 % en peso con respecto al volumen total de la solución.

65 **[0044]** Con una máquina de dispensación automática, se depositó 1  $\mu$ l de la solución 1) sobre la superficie del electrodo de trabajo e, inmediatamente después, con la misma técnica de dispensación automática, se depositó 1  $\mu$ l de la solución 2) sobre la misma superficie del electrodo de trabajo, produciendo así 2  $\mu$ l de una solución de cloruro férrico y hexacianoferrato de potasio sobre dicha superficie.

**[0045]** Después de 10 minutos, los electrodos modificados de esta manera se lavaron con unos pocos mililitros de una solución de HCl 10 mM, y a continuación se pusieron en una estufa a 100 °C durante 1 hora.

5 **[0046]** El procedimiento descrito anteriormente dio como resultado la deposición sobre el electrodo de una capa extremadamente compacta y estable de azul de Prusia, con una alta densidad de superficie del azul de Prusia sobre el electrodo de trabajo.

10 **[0047]** Esto último se confirma por los resultados de la voltametría cíclica que se muestran en Figura 2, que permitió el cálculo de la cantidad de azul de Prusia sobre la superficie del electrodo de trabajo: el valor de la densidad de superficie medida es de aproximadamente 100 nmol/cm<sup>2</sup>, mucho mayor que el presentado en la bibliografía hasta la fecha usando diferentes técnicas de deposición.

#### Ejemplo 2

15 Determinación de la actividad catalítica del azul de Prusia para el electrodo preparado en el Ejemplo 1

**[0048]** Se verificaron las propiedades del electrodo modificado preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 por medio de voltametría cíclica, en el intervalo de potencial de -0,4 a 0,4 V.

20 **[0049]** La Figura 2 muestra los voltamogramas obtenidos para el electrodo serigrafiado sin modificar y para el mismo electrodo modificado con azul de Prusia, preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Para este último electrodo, en los voltamogramas se puede observar el incremento en la onda catódica hasta 0,05 V aproximadamente en presencia de peróxido de hidrógeno, que muestra la actividad catalítica de la capa de azul de Prusia depositada sobre el electrodo.

25 Ejemplo 3 (comparación)

Preparación del electrodo modificado como se describe por Ricci et al. en *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 165-174

30 **[0050]** Siguiendo el procedimiento descrito previamente en el artículo de Ricci et al., *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 165-174, se modificó un electrodo serigrafiado sobre una lámina de poliéster, que comprende un electrodo de trabajo de forma circular con un diámetro de 2 mm preparado con colorante de grafito y un electrodo de referencia de plata; la superficie del electrodo de trabajo está delimitada por un colorante fabricado de un material aislante.

35 **[0051]** A continuación se prepararon las siguientes dos soluciones: 1) solución 0,1 M de ferricianuro de potasio K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en HCl 10 mM y 2) solución de cloruro férrico 0,1 M en HCl 10 mM.

40 **[0052]** Antes de la deposición de las dos soluciones por medio del método electroquímico, procedimiento no adecuado para su automatización y mucho más laborioso y prolongado que el del Ejemplo 1, el electrodo se pre-trató mediante la aplicación de un potencial constante igual a 1,7 V frente a Ag/AgCl durante 3 minutos.

45 **[0053]** Usando una máquina de dispensación automática, se depositaron 20 µl de la solución 1) sobre la superficie del electrodo de trabajo e, inmediatamente después, usando la misma técnica de deposición, se depositaron 20 µl de la solución 2) sobre la misma superficie del electrodo de trabajo, obteniendo así 40 µl de una mezcla de cloruro férrico y hexacianoferrato de potasio.

50 **[0054]** Después de 10 minutos, los electrodos modificados de esta manera se lavaron en unos pocos mililitros de una solución 10 mM de HCl, y a continuación se pusieron en una estufa a 100 °C durante 1 hora. Se evaluó la actividad electrocatalítica de la capa de azul de Prusia depositada de esta manera siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 2. La Figura 3 muestra los voltamogramas cíclicos obtenidos para el electrodo serigrafiado modificado como se ha descrito anteriormente.

55 Ejemplo 4

Determinación de los rendimientos analíticos de los electrodos modificados de acuerdo con la invención y de acuerdo con la técnica anterior

60 **[0055]** Los rendimientos analíticos de los electrodos modificados con azul de Prusia preparados como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 3 se sometieron a ensayo considerando la respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la estabilidad operativa y no operativa y la reproducibilidad. En lo que respecta a la reproducibilidad, los valores de reproducibilidad, calculados como porcentaje de la desviación típica relativa (abreviada a continuación como %RSD), para el electrodo modificado como se ha descrito en el Ejemplo 3 son del 20 % aproximadamente, incompatible con cualquier tipo de aplicación industrial, mientras que se calculó un %RSD del 5 % para el electrodo de la invención, modificado como se describe en el Ejemplo 1.

5 **[0056]** En lo que respecta al espesor del azul de Prusia depositado sobre los electrodos, con el procedimiento de la técnica anterior descrito en el Ejemplo 3, se obtiene una capa de azul de Prusia con una densidad superficial de entre 1 y 10 nmol/cm<sup>2</sup>, por tanto muy inferior a la obtenida para el electrodo de la invención del Ejemplo 1 (100 nmol/cm<sup>2</sup> aproximadamente) como se muestra en la comparación de las voltametrías cíclicas (Figura 4).

10 **[0057]** Esto produce una mayor estabilidad operativa del azul de Prusia, hasta un máximo de 200 horas. La Figura 5, por ejemplo, muestra el seguimiento continuo con una técnica de flujo, obtenida con los dos electrodos preparados siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 3. Como se puede observar claramente, con una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 5 mM, los dos electrodos proporcionan una reducción de corriente debido a la actividad catalítica del azul de Prusia, pero el electrodo del Ejemplo 1 muestra una mayor estabilidad operativa a largo plazo, con una reducción en la señal inicial de únicamente el 20 % después de 200 horas.

15 **[0058]** En el caso del electrodo de la técnica anterior preparado en el Ejemplo 3, se observa una reducción más marcada igual al 70 % aproximadamente después de 200 horas.

#### Ejemplo 5

##### Preparación del biosensor

20 **[0059]** El electrodo modificado preparado como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 se usó como soporte para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa, con el fin de obtener un biosensor útil para la monitorización continua de glucosa en sangre.

25 **[0060]** Para este fin se depositaron 200 nl de una solución de glutaraldehído (0,025 % v/v en H<sub>2</sub>O) sobre la superficie del electrodo de trabajo, modificado previamente con azul de Prusia como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Después de 25 minutos aproximadamente, se depositaron 200 nl de una mezcla obtenida disolviendo 10 mg de la enzima glucosa oxidasa en 1 ml de una solución acuosa de Nafion<sup>®</sup> (0,1 %) sobre la misma superficie del electrodo de trabajo. De nuevo en este caso, se dejó reposar durante 25 minutos aproximadamente para así obtener el secado total de la solución depositada.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un electrodo serigrafiado modificado con azul de Prusia, **caracterizado por que** comprende la deposición secuencial sobre la superficie de dicho electrodo serigrafiado de una solución que comprende el ión hierro (III) o hierro (II) y al menos un agente superficialmente activo en un disolvente adecuado y una solución que comprende el ión ferrocianuro (II) o ferricianuro (III) y al menos un agente superficialmente activo en un disolvente adecuado, teniendo dichas soluciones concentraciones tales como para obtener directamente la formación de azul de Prusia sobre la superficie del electrodo; en el que las soluciones se depositan en un volumen igual y una concentración igual; en el que el electrodo modificado a continuación se deja secar en una estufa a una temperatura entre 50 °C y 200 °C durante un periodo de entre 10 minutos y 3 horas; en el que dicho agente superficialmente activo se selecciona del grupo constituido por laurilsulfato sódico y etoxisulfato de laurilo, cloruro de benzalconio, derivados de polioxietileno de ésteres de ácidos grasos con sorbitol, y sus mezclas.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho electrodo serigrafiado no se ha sometido a pretratamiento antes de dicha deposición secuencial de las soluciones.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución que comprende el ión hierro (III) o hierro (II) es una solución ácida con un pH entre 0,5 y 6,0 de un compuesto seleccionado del grupo constituido por sales de hierro (III) o hierro (II) de ácidos inorgánicos.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha sal de hierro (III) o hierro (II) de ácidos inorgánicos se selecciona entre cloruro férrico, sulfato férrico y nitrato férrico.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha solución es una solución de cloruro férrico en HCl acuoso 0,01 M que tiene un pH de 2,0.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución que comprende el ión hexacianoferrato (III) es una solución ácida con un pH entre 0,5 y 6,0 de una sal que contiene el ión ferrocianuro (II) o ferricianuro (III).
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha sal se selecciona entre hexacianoferrato de sodio, de potasio, de amonio y de cobalto.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha solución es una solución de ferricianuro de potasio  $K_3Fe(CN)_6$  en HCl acuoso 0,01 M que tiene un pH de 2,0.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas soluciones tienen una concentración igual de entre 20 mM y 2 mM, y se depositan en un volumen igual de entre 100 nl y 4  $\mu$ l para una superficie del electrodo de entre 0,314 mm<sup>2</sup> y 3,14 cm<sup>2</sup>, preferentemente de 3,14 mm<sup>2</sup>.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho electrodo serigrafiado está fabricado de un material inerte serigrafiado con tinta de grafito.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende las fases de dejar reposar las soluciones depositadas durante 10 minutos, lavar la superficie del electrodo de trabajo con una solución de lavado constituida por una solución ácida acuosa con un pH entre 0,5 y 6,0, lavar con agua destilada si es necesario y dejar secar en una estufa a una temperatura entre 50 °C y 200 °C, durante un periodo de entre 10 minutos y 3 horas.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha solución de lavado es una solución acuosa de HCl 0,01 M que tiene un pH de 2,0.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el electrodo se deja secar en una estufa a una temperatura de 100 °C durante un periodo de 1 hora y 30 minutos.
14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente superficialmente activo se selecciona entre agentes superficialmente activos catiónicos, aniónicos, anfóteros y sus mezclas, y se añade en cantidades para cada solución de entre el 0,01 y el 10 % en peso con respecto al volumen total de la solución.
15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente superficialmente activo es monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, en una cantidad del 0,05 % en peso con respecto al volumen total de la solución.
16. El electrodo serigrafiado modificado con azul de Prusia preparado con el proceso como se define en las reivindicaciones 1-15, en el que la cantidad de azul de Prusia es de 100 nmol/cm<sup>2</sup>.
17. Un electrodo enzimático que comprende el electrodo serigrafiado modificado como se define en la reivindicación 16 y una enzima adecuada inmovilizada sobre dicho electrodo, seleccionada de manera que su producto se pueda oxidar o reducir electroquímicamente sobre dicho electrodo modificado.



18. El electrodo enzimático de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha enzima es la enzima glucosa oxidasa.
- 5 19. Un biosensor enzimático que comprende el electrodo enzimático como se define en las reivindicaciones 17-18 como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia, un contra-electrodo si es necesario y una celda para albergar el fluido biológico a analizar, de manera que este último pueda entrar en contacto con la enzima inmovilizada sobre dicho electrodo enzimático.
- 10 20. El biosensor de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende dicho electrodo serigrafiado y dicho electrodo de referencia como únicos electrodos.
- 15 21. Un método para la determinación de la cantidad de analito en un fluido biológico que comprende la aplicación de un valor de potencial adecuado entre un electrodo enzimático como se define en las reivindicaciones 17-18 y un electrodo de referencia incluido en el biosensor enzimático como se define en las reivindicaciones 19-20, y la lectura de la señal de corriente generada.
- 20 22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho analito es glucosa y dicho potencial aplicado se encuentra entre -250 y +200 mV.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho potencial aplicado es igual a -50 mV.

Figura 1

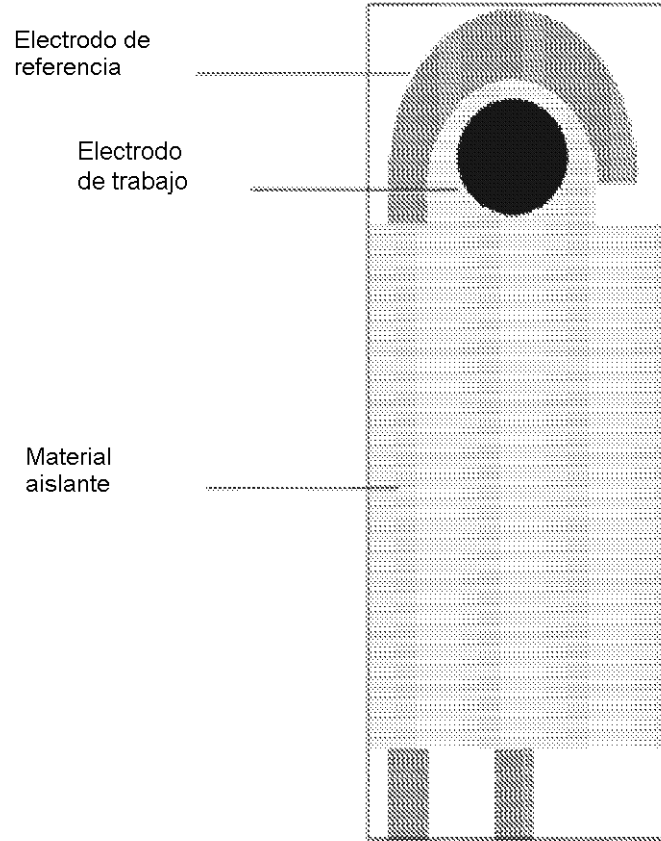


Figura 2

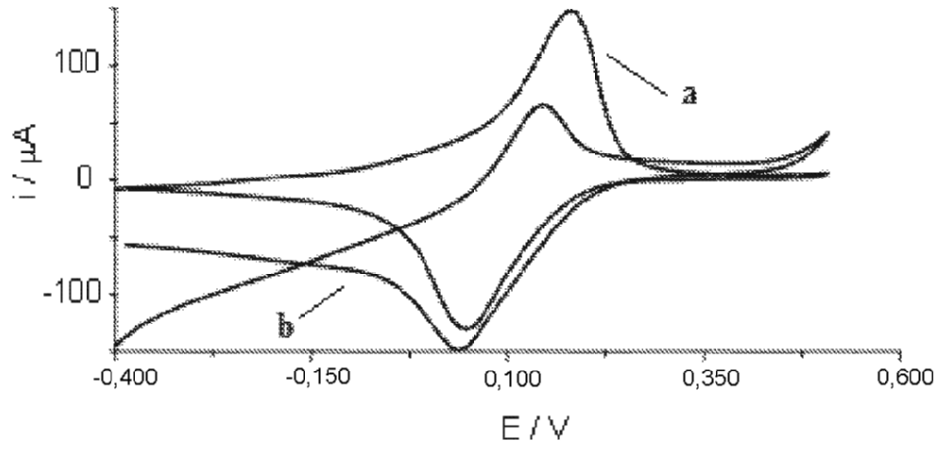


Figura 3

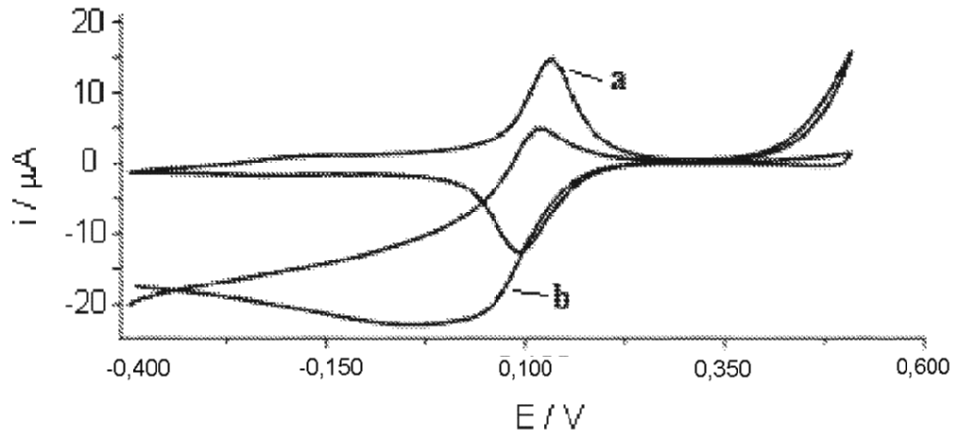


Figura 4

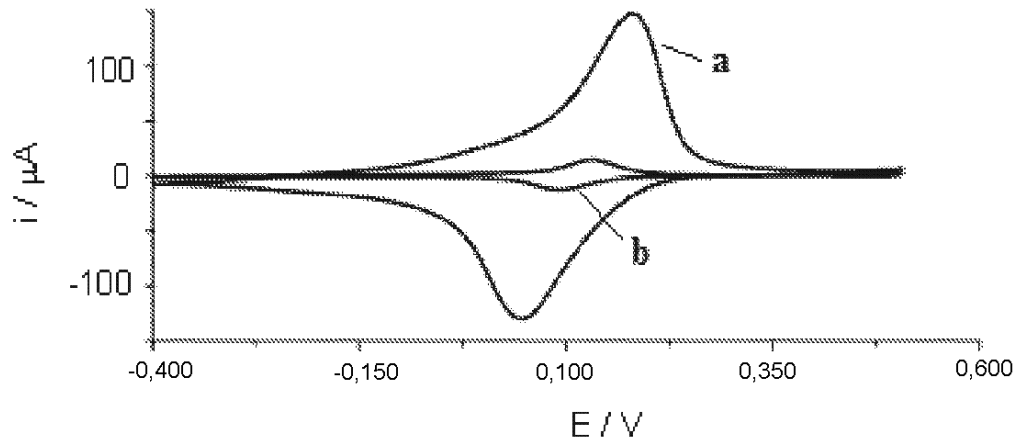


Figura 5a

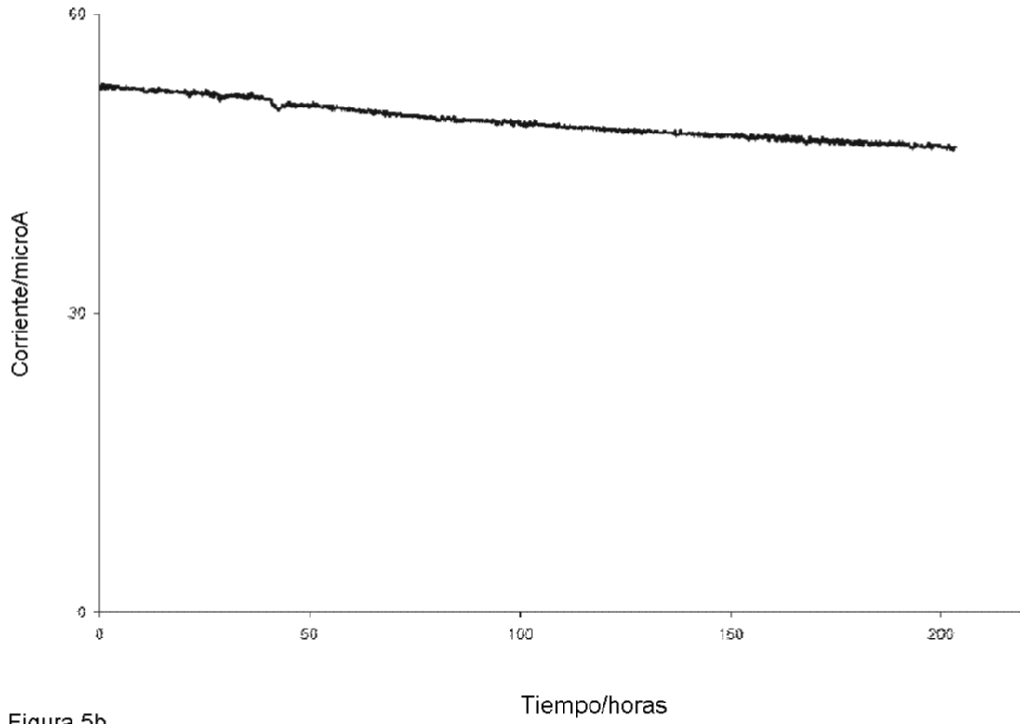


Figura 5b

