

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 577**

21 Número de solicitud: 201531868

51 Int. Cl.:

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

22.12.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2016

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

22.12.2016

Fecha de la concesión:

10.01.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.01.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
(100.0%)**

Jordi Girona, 31

08034 Barcelona (Barcelona) ES

72 Inventor/es:

ARMELIN DIGGROC, Elaine;

FABREGAT JOVÉ, Georgina;

LLORCA PIQUE, Jordi y

ALEMÁN LLANSÓ, Carlos

54 Título: **Sensor electroquímico y procedimiento de recubrimiento, procedimiento de fabricación y usos correspondientes**

57 Resumen:

Sensor electroquímico y procedimiento de recubrimiento, procedimiento de fabricación y usos correspondientes. Procedimiento de recubrimiento de un sensor electroquímico que comprende las etapas de:

- recubrir un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, con un polímero orgánico,
- aplicar a dicho recubrimiento un tratamiento con plasma frío.

Este procedimiento permite fabricar sensores electroquímicos con un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, y un recubrimiento polimérico orgánico modificado. Estos nuevos sensores son aptos para la detección de dopamina, glucosa, ácido úrico y ácido ascórbico, entre otros.

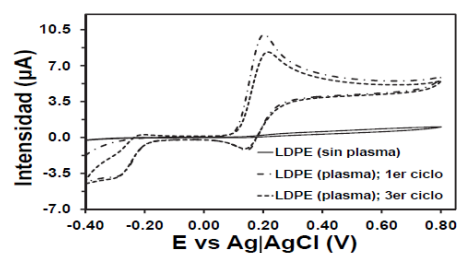


Fig. 6

ES 2 560 577 B2

SENSOR ELECTROQUÍMICO Y PROCEDIMIENTO DE RECUBRIMIENTO,
PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y USOS CORRESPONDIENTES

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la invención

La invención se refiere a un sensor electroquímico para la detección de diversas sustancias orgánicas, como por ejemplo dopamina, glucosa, ácido úrico y/o ácido
10 ascórbico, en diversos fluidos corporales, como por ejemplo en sangre y/o en orina.

La invención también se refiere a un procedimiento de recubrimiento de un sensor electroquímico de acuerdo con la invención, a un procedimiento de fabricación de un sensor electroquímico de acuerdo con la invención y a diversos usos de los mismos.

15

Estado de la técnica

La dopamina (DA), un miembro de la familia de las catecolaminas, actúa como un
20 importante neurotransmisor en el sistema nervioso central de los mamíferos modulando las funciones vitales, tales como el movimiento voluntario. Está relacionado con las funciones cognitivas y motoras. En los pacientes con la enfermedad de Parkinson, las neuronas (dopaminérgicas) de liberación de DA en el sistema nervioso central son disfuncionales o moribundas, provocando una falta de dopamina en los
25 territorios diana, que deriva en funciones motoras alteradas.

Entre los métodos potenciales desarrollados en las pasadas décadas para la detección de DA, las técnicas electroquímicas han predominado gracias a sus importantes ventajas, tales como una respuesta rápida, un bajo coste y una elevada sensibilidad.
30 Sin embargo, hay algunas limitaciones para medir la DA en condiciones fisiológicas mediante métodos electroquímicos convencionales. Las principales están relacionadas con la selectividad hacia otras especies que coexisten en el organismo, tales como ácido ascórbico (AA) y ácido úrico (UA), que se oxidan casi al mismo

potencial. Asimismo, la detección de niveles muy bajos de DA (10 nM – 10 μ M) representa un reto para la sensibilidad. En publicaciones recientes, se ha informado de la existencia de diversas estrategias que utilizan, entre otros, nanocompuestos, grafeno, polímeros conductores (PC), nanopartículas catalíticas, o nanotubos de carbono, para solventar dichos problemas. No obstante, el desarrollo de estos sensores electroquímicos hacen necesario un gran número de etapas de fabricación, puesto que la aplicación de los compuestos mencionados anteriormente normalmente requiere funcionalización, incorporación de nano-objetos, procesamiento de la nanocomposición, procesos sintéticos multi-etapa, etc.

10

Existe, por lo tanto, la necesidad de desarrollar nuevos sensores electroquímicos para la detección de diversas sustancias orgánicas, especialmente dopamina, glucosa, ácido úrico y/o ácido ascórbico, en diversos fluidos corporales, como por ejemplo en sangre y/o en orina.

15

Exposición de la invención

La invención tiene por objeto superar estos inconvenientes. Esta finalidad se consigue mediante un procedimiento de recubrimiento de un sensor electroquímico caracterizado por que comprende las etapas de:

20

- recubrir un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, con un polímero orgánico,

25

- aplicar a dicho recubrimiento un tratamiento con plasma frío.

Preferentemente el plasma es un plasma atmosférico, un plasma en vacío o un plasma de corona de energía comprendida entre 0,1 mJ/cm² y 100 J/cm² en una atmósfera con oxígeno o nitrógeno u otro gas inerte.

30

Ventajosamente el polímero orgánico es un polímero no activo electroquímicamente, y preferentemente es un polímero del grupo formado por polietileno, poli(tetrametilen-

succinato), polipropileno, polivinilpirrolidona, polióxido de etileno, poli(4-vinilfenol), policaprolactona, poliamida PA 66, poliestireno, ácido poliacrílico y la celulosa.

Alternativamente, el polímero orgánico puede ser ventajosamente un polímero electroquímicamente activo (es decir, un polímero con enlaces conjugados o un polímero conductor), y preferentemente es un polímero del grupo formado por poli(3,4-etilendioxitiofeno) y poli(*N*-cianoetilpirrol).

Preferentemente el tiempo de aplicación del plasma es mayor de 1 s (y ventajosamente es mayor de 15 s) y/o es menor de 120 s.

Ventajosamente el sustrato rico en carbono es de un material del grupo formado por grafito, carbono vítreo, carbonos nanoestructurados (preferentemente grafeno o nanotubos de carbono) y fulerenos.

La invención también tiene por objeto un procedimiento de fabricación de un sensor electroquímico que comprende un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, caracterizado por que incluye una etapa de tratamiento superficial por plasma de dicho sustrato.

La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de fabricación de un sensor electroquímico, que comprende un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, caracterizado por que comprende una etapa de recubrimiento de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención es un sensor electroquímico caracterizado por que comprende un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, y un recubrimiento polimérico orgánico modificado, donde el recubrimiento polimérico modificado es obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la invención.

La invención también tiene por objeto diversos usos:

- el uso de un procedimiento de acuerdo con la invención para la fabricación de un sensor electroquímico. Preferentemente el sensor es para la detección de dopamina, glucosa, ácido úrico y/o ácido ascórbico.
- el uso de un sensor de acuerdo con la invención para la detección de dopamina, glucosa, ácido úrico y/o ácido ascórbico.

Breve descripción de los dibujos

Otras ventajas y características de la invención se aprecian a partir de la siguiente descripción, en la que, sin ningún carácter limitativo, se relatan unos modos preferentes de realización de la invención, haciendo mención de los dibujos que se acompañan. Las figuras muestran:

Fig. 1, Voltamogramas de control de 100 μ M DA, 100 μ M UA y 100 μ M AA en una solución de tampón fosfato (PBS) 0,1 M registrados utilizando substratos (electrodos) no tratados: carbono vítreo (GCE) GCE desnudo, y GCE recubierto con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y poli(*N*-cianoetilpirrol) (PNCPy).

Fig. 2, Voltamogramas de control de 100 μ M DA, 100 μ M UA y 100 μ M AA en una solution de tampón fosfato (PBS) 0,1 M registrados utilizando substratos (electrodos) tratados con plasma-aire: GCE desnudo, y GCE recubierto con poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) y poli(*N*-cianoetilpirrol) (PNCPy).

Fig. 3, Voltamogramas de control de 100 μ M DA en 0,1 M PBS recogidos en GCE recubierto con PEDOT tratado con plasma frío preparado utilizando diferentes tiempos de aplicación de plasma-aire (t_{cp}).

Fig. 4, determinación del límite de detección de DA de los GCE recubiertos con PEDOT y PNCPy con un tratamiento con plasma-aire.

Fig. 5, variación de la intensidad de pico anódico (i_p) en los GCE recubiertos con PEDOT con tratamiento con plasma frío con respecto al tiempo de aplicación de plasma (t_{cp}).

5

Fig. 6, voltamograma de control de 1 mM DA en 0,1 M PBS en el GCE recubierto con polietileno de baja densidad (LDPE), sin y con tratamiento con plasma-aire. Se muestra el primer y tercer ciclo para el electrodo tratado con plasma-aire.

10 Fig. 7, Voltamogramas de control de 100, 10 y 1 μ M DA en GCE recubiertos con LDPE tratados con plasma-aire. Derecha: Voltamogramas completos; Izquierda: ampliación de la zona asociada con la oxidación de DA. En todos los casos: velocidad de exploración: 100 mV/s; potenciales finales e iniciales: -0,40; potencial inverso: +0,80 V.

15 Fig. 8, micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) de GCE recubierto con PEDOT no tratado con plasma.

Fig. 9, micrografía SEM de GCE recubierto con PEDOT tratado con plasma.

20 Fig. 10, voltamperometrías cíclicas de la dopamina 10 μ M en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire.

Fig. 11, ampliación de las voltamperometrías cíclicas en la zona de oxidación de la dopamina 10 μ M en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE
25 tratado con plasma-aire.

Fig. 12, intensidad del pico de oxidación de la urea frente a ciclos de oxidación y reducción en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire.

30

Fig. 13, intensidad del pico de oxidación de la dopamina frente a ciclos de oxidación y reducción en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire.

Fig. 14, ampliación de las voltamperometrías cíclicas en la zona de oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire.

5

Fig. 15, intensidad del pico de oxidación de la DA frente a ciclos de oxidación y reducción en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire.

10 Fig. 16, intensidad absoluta y del pico de la DA empleando GCE recubierto con polímero convencional y tratado con plasma-aire.

Fig. 17, intensidad del pico de la oxidación de la DA empleando GCE recubierto con polímero convencional y tratado con plasma-aire.

15

Fig. 18, potencial de oxidación de la DA empleando GCE recubierto con polímero convencional y tratado con plasma-aire.

Fig. 19, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0.1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con polipropileno isotáctico tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

20

Fig. 20, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con polivinilpirrolidona (peso molecular medio aproximado: 40.000) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

25

Fig. 21, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con poli(óxido de etileno) (peso molecular medio aproximado: 600.000) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

30

Fig. 22, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con poli(4-vinilfenol) (peso molecular medio aproximado: 25.000) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

5

Fig. 23, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con policaprolactona (peso molecular medio aproximado: 7.000) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

10

Fig. 24, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con nailon 66 (poliamida PA 66) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

15

Fig. 25, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con poliestireno (del fabricante Polymer Additives) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

20

Fig. 26, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con ácido poliacrílico (25% en peso en agua, peso molecular medio aproximado: 240.000) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

25

Fig. 27, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con poli(butilen succinato) (comercializado bajo el nombre comercial Bionolle®) tratado con y sin plasma-aire. Los resultados se compraran con GCE tratado con y sin plasma-aire.

30

Fig. 28, voltamperometría cíclica de la oxidación de DA 10 μ M en PBS 0,1M (buffer fosfato salino, pH 7,2) empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma frío en atmósfera oxidante y reductora.

Fig. 29, Gráfico densidad de corriente-tiempo para la detección cronoamperométrica glucosa 1 mM empleando un GCE recubierto con PEDOT tratado con plasma-aire sobre el que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa. La inyección de glucosa en la celda de detección se inicia en 300 s y realiza cada 100 s.

Fig. 30, Gráfico densidad de corriente-tiempo para la detección cronoamperométrica glucosa 1 mM, UA 1 mM, AA 1mM y DA 1 mM empleando un GCE recubierto con PEDOT tratado con plasma-aire sobre el que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa. La inyección de la glucosa y los distintos interferentes en la celda de detección se inicia en 500 s y realiza cada 100 s.

Fig. 31, determinación del límite de detección de glucosa del GCE recubierto con PEDOT y un tratamiento con plasma-aire. La enzima glucosa oxidasa se inmovilizó en la superficie del electrodo.

Descripción detallada de unas formas de realización de la invención

Primera parte

Uno de los resultados sorprendentes de la presente invención es la aplicación de un plasma frío (plasma en el que los iones y electrones no están en equilibrio térmico) como técnica muy simple y eficaz para la preparación de sensores electroquímicos de DA (dopamina). Inicialmente, los experimentos se realizaron empleando dos polímeros conductores específicamente PEDOT y PNCPy, que se depositaron sobre los electrodos de GCE desnudos mediante cronoamperometría. La respuesta de los dos PC con respecto a DA resultó ser totalmente diferente. La detección selectiva y simultánea de DA, UA (ácido úrico) y AA (ácido ascórbico) utilizando PNCPy es difícil porque los picos de oxidación de cada una de estas sustancias orgánicas son débiles y están parcialmente solapados entre sí mientras que, por contra, los picos de oxidación están bien resueltos cuando se emplean electrodos recubiertos con PEDOT. El comportamiento de PNMPy mejora cuando la película está recubierta con

nanopartículas de oro (AuNPs), lo cual demuestra la actividad electrocatalítica promovida por estas últimas. En contraposición, las propiedades de los electrodos PEDOT para la detección selectiva de DA permanecen prácticamente inalteradas tras la incorporación de AuNPs.

5

Se modificaron tanto las películas de PEDOT como las de PNCPy generadas por polimerización anódica sobre un electrodo de CGE mediante la aplicación del tratamiento de superficie de plasma frío (plasma de corona en atmósfera ambiental a aproximadamente $0,5 \text{ J/cm}^2$ durante 2 minutos).

10

Los ensayos de detección de DA, UA y AA ($100 \text{ } \mu\text{M}$ cada) se llevaron a cabo mediante voltametría cíclica (CV) utilizando una celda de vidrio que contenía 10 mL de PBS (solución tampón de fosfato salino) $0,1 \text{ M}$ a temperatura ambiente. Las Figs. 1 a 5 muestran la respuesta voltamétrica de los GCE recubiertos con PNCPy y PEDOT no tratados y tratados con plasma. Los voltamogramas registrados utilizando GCE desnudos se han incluido a título comparativo. A pesar de que el tratamiento con plasma provoca una importante reducción de la intensidad pico anódico a $0,70\text{V}$ para todos los sistemas, cabe destacar que este efecto es relativamente reducido para las intensidades anódicas asociadas a la oxidación de los tres analitos. Además, tal como puede observarse, tanto los electrodos con PEDOT como con PNCPy tratados con plasma son capaces de detectar selectivamente la oxidación de DA, UA, y AA, mientras que el PNCPy no tratado no es capaz de discriminar selectivamente entre ellos. En lo que respecta al GCE desnudo, no es capaz de detectar selectivamente la presencia de AA en la mezcla, independientemente del tratamiento con plasma. En el caso de electrodos tratados con plasma, se han identificado picos pequeños o incluso imperceptibles en algunos voltamogramas (marcados con flechas en la figura 1. Estos picos, que se desplazan con respecto a los picos de oxidación identificados, se han asociado con procesos de oxidación de AA (PNCPy, PEDOT y GCE desnudo) o UA (solo PNCPy) mediante especies reactivas no predominantes creadas durante el tratamiento con plasma frío.

En las Figs. 1 y 2 se muestran voltamogramas de control de $100 \text{ } \mu\text{M}$ DA, $100 \text{ } \mu\text{M}$ UA y $100 \text{ } \mu\text{M}$ AA en $0,1 \text{ M}$ PBS a GCE desnudo, y del GCE recubierto con PEDOT y

PNMPy. Las flechas indican procesos de oxidación. Velocidad de exploración: 100 mV/s. Potenciales iniciales y finales: -0,40 V; potencial inverso: +0,80 V.

Una cuestión importante es la influencia que tiene el tiempo en que se aplica la potencia de plasma (t_{cp}) en la detección eficaz de DA. Con este fin, los GCE recubiertos con PEDOT se trataron considerando diferentes valores t_{cp} (es decir, de 15 a 120 s). La Fig. 3 compara los voltamogramas de 100 μ M DA en 0,1 M PBS con estos electrodos tratados. Tal como se puede observar, la influencia de t_{cp} en el potencial de pico de oxidación es nulo ($E=0,176$ V en todos los casos). De manera similar, la influencia de t_{cp} en la intensidad de pico anódico (i_p) es muy reducida. Esto se ve reflejado en la Fig. 5 que representa la media del i_p , teniendo en cuenta cuatro muestras distintas, con respecto a t_{cp} . Por lo tanto, i_p aumenta de 1,50 a 1,63 μ A cuando t_{cp} aumenta de 15 a 120 s. Según estos resultados, t_{cp} no es un factor decisivo para el proceso de detección una vez ha superado los 15 s.

En la Fig. 4 se muestra la determinación del límite de detección de DA (en ausencia de UA y AA) de los GCE recubiertos con PEDOT y PNCPy con un tratamiento con plasma frío mediante CV utilizando una velocidad de exploración de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Los resultados se derivaron de la adición estándar de 10 μ L de DA en 10 mL de 0,1 M PBS (es decir, un intervalo lineal de 0,5 a 100 μ M DA). La intensidad de pico anódico (i_p) aumenta con la concentración de DA para los dos electrodos. El límite de detección, que se determinó utilizando una curva de calibración para la concentración de DA comprendida entre 0,5 y 5 μ M (recuadro) estuvo comprendido entre 140 y 750 nM para PEDOT y PNCPy, respectivamente. Estos valores son notablemente inferiores a los obtenidos para las muestras no tratadas, y evidencian una mejora no únicamente de la resolución (especialmente para PNCPy).

Métodos experimentales:

30 Materiales. 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT), N-(2-cianoetil)pirrol (NCPy), acetonitrilo, perclorato de litio anhidro (LiClO_4), hidrocloreuro de DA (3-hidrocloreuro de hidroxitiramina), AA (L-configuración, cristalino), UA (cristalino) de grado de calidad analítica. Todos los productos químicos, que fueron adquiridos a la compañía Sigma

Aldrich (España), se utilizaron sin purificación adicional. La solución amortiguadora de fosfato (PBS) 0,1 M con pH= 7,4 se preparó como disolución electrolítica mezclando cuatro soluciones madre de NaCl, KCl, NaHPO₄ y KH₂PO₄. Se utilizó nitrógeno de alta pureza para la desaireación de las disoluciones acuosas preparadas.

5

Síntesis de polímeros conductores. Se prepararon películas de PEDOT y PNCPy mediante cronoamperometría (CA) bajo un potencial constante de 1,40 V utilizando una celda de dos compartimentos y tres electrodos en atmósfera de nitrógeno (99,995% de pureza) a 25 °C. Un electrodo de carbón vítreo (GCE) desnudo con un diámetro de 2 mm se utilizó como electrodo de trabajo, mientras que una lámina de acero AISI 316 con un área de 1 cm² se utilizó como contraelectrodo. La superficie del electrodo de carbón vítreo se pulió con polvo de alúmina y se limpió mediante ultrasonificación antes de la deposición del polímero. El electrodo de referencia fue un electrodo Ag|AgCl que contenía una solución acuosa saturada de KCl ($E^{\circ} = 0,222$ V vs. electrodo de hidrógeno estándar a 25°C), que se conectó con el compartimento de trabajo a través de un puente salino que contenía la solución electrolítica. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en un potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT302N (Ecochimie, Holanda) equipado con el módulo ECD para medir densidades de corriente muy bajas (100 μ A-100 pA), que se conectó con un ordenador controlado por medio del software NOVA 1.6.

20

Se obtuvieron películas de PEDOT y PNCPy utilizando 10 mM de una solución de monómero en acetonitrilo con 0,1 M de LiClO₄ y un periodo de polimerización comprendido entre 6 y 10 s, respectivamente.

25

Tratamiento con plasma frío. Los GCE recubiertos con PEDOT y PNCPy se prepararon con una descarga corona en una atmósfera ambiental utilizando un BD-20AC de la compañía Electro-Technic Products. El BD-20AC funciona a una frecuencia muy elevada en el rango de MHz, generando un campo eléctrico creado alrededor del electrodo que se utiliza para el tratamiento de la superficie de polímeros. La unidad consiste en una unidad de control de potencia y un mango de alta tensión separado. Lo que lo diferencia de otros modelos es que genera una salida de alta tensión ajustable comprendida entre 10.000 y 45.000 voltios a una elevada frecuencia

30

de 4,5 MHz. El tratamiento de los polímeros se llevó a cabo utilizando un electrodo de
 aguja de punta plana (en inglés, spring tip wire electrode) y una tensión de 45.000
 voltios a una elevada frecuencia de 4,5 MHz en todos los casos. Tras el tratamiento
 con plasma, los electrodos GCE recubiertos se utilizaron para los experimentos de
 5 detección de DA en un periodo de 24 horas.

Mediciones electroquímicas para la detección de DA. La detección electromecánica se
 llevó a cabo mediante voltametría cíclica (CV) utilizando el equipo Autolab
 PGSTAT302N descrito anteriormente. Todos los experimentos electroquímicos se
 10 llevaron a cabo en una celda de vidrio que contenía 10 mL de 0,1 M PBS (pH=7,4) a
 temperatura ambiente y equipada con Ag|AgCl saturados como electrodo de referencia
 y un cable de platino (Pt) como contraelectrodo. Los voltamogramas se registraron en
 el intervalo potencial comprendido entre -0,40 y 0,80 V a una velocidad de exploración
 de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a menos que otra velocidad de exploración sea explícitamente
 15 especificada. Todos los electrodos estuvieron en contacto con la solución electrolítica
 durante 5 minutos antes de las mediciones de CV.

Segunda parte

20 Como prueba de concepto, se fabricaron y comprobaron unos sensores de GCE
 recubiertos con un polímero muy económico y electroquímicamente inerte: polietileno
 de baja densidad. El polietileno de baja densidad (LDPE) se depositó sobre el GCE
 mediante disolución (34,4 mg de LDPE disueltos en 10 mL de diclorobenceno a 95°C
 por agitación durante 4 horas). Para el GCE recubierto con LDPE sin tratamiento con
 25 plasma frío, el voltamograma cíclico registrado en una disolución de 0,1 M PBS con 1
 mM de DA no prevé ningún pico de oxidación (Fig. 6), que indique que, tal como se
 esperaba, LDPE no puede detectar dicho neurotransmisor. En contraposición, el
 voltamograma registrado que utiliza un electrodo fabricado de manera idéntica, pero
 que aplica un tratamiento con plasma frío durante 1 minuto, muestra un marcado
 30 potencial a 0,20 V que corresponde a la oxidación de DA (Fig. 6). Considerando que la
 concentración de DA estimada en la sinapsis es de 1,6 mM, este resultado corrobora
 que se pueden fabricar detectores eficientes combinando una matriz orgánica con un
 simple tratamiento plasma-aire. Además, este detector es muy estable, puesto que

solo disminuye $\sim 2\mu\text{A}$ (Fig. 6) tras tres ciclos de reducción de oxidación consecutivos (es decir, ciclos de detección).

En la Fig. 6 se muestra el voltamograma de control de 1 mM DA en 0,1 M PBS en el GCE recubierto con LDPE. Los voltamogramas registrados utilizando electrodos no tratados (línea continua) y electrodos tratados con plasma frío (guión-punto: primer ciclo de detección; guión-guión-punto: tercer ciclo de detección (.Velocidad de exploración: 100 mV/s. Potenciales iniciales y finales: -0.40 V; potencial inverso: +0.80 V. Tal como se puede observar, los electrodos recubiertos con LDPE tratados con un simple plasma-aire durante 1 minuto son capaces de detectar concentraciones de DA similares a las estimadas para la sinapsis durante varios ciclos.

Se llevaron a cabo ensayos adicionales con GCE recubiertos con LDPE tratados con plasma frío utilizando 100, 10 y 1 μM concentraciones de DA. Los resultados, que se muestran en la Fig. 7 indican que la oxidación de las moléculas de DA se detectó como un pico de oxidación claro para la solución de 100 μM ($i_p = 0,033 \mu\text{A}$ y $E = 0,007 \mu\text{A}$ y $E = 0,164 \text{ V}$). Desafortunadamente, a pesar de que la detección del neurotransmisor fue casi imperceptible en la solución de 1 μM , los resultados mostrados en la Fig. 7 son muy esperanzadores dada la simplicidad del electrodo. Por lo tanto, debería recalcarse que el límite para la detección electromecánica de DA en películas de 3 capas sofisticadas realizadas a partir de PEDOT (capa externas e internas) y poli(N-metilpirrol) (capa intermedia para crear un efecto dieléctrico) recubierto con AuNPs en la capa externa fue de 2 μM , mientras que el límite en un GCE recubierto con un CP especialmente diseñado para detectar DA, poli(hidroximetil-3,4-etilendioxitiofeno) fue ligeramente superior.

Se examinó la superficie de los GCE recubiertos con PEDOT tratados y no tratados con plasma utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) y espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDX). En las Figs. 8 y 9 se muestran micrográficas SEM de GCE recubierto con PEDOT no tratado y tratado con plasma, respectivamente. La morfología relativamente compacta de las muestras no tratadas (Fig. 8) que contiene C, S, O y Cl (el cloro es debido al dopante de perclorato) se transforma en una red muy porosa de especies activas compuesta únicamente por C y

O (Fig. 10). Por lo tanto, la actividad electroquímica de los GCE recubiertos con polímeros tratados con plasma probablemente debería atribuirse esencialmente a la incorporación de especies activas en la superficie, que son posiblemente las responsables de la detección de analitos oxidados y reducidos. Se han observado

5 características similares en los GCE recubiertos con LDPE.

Tercera parte

1 - GCE-LDPE con plasma: Estabilidad y detección 10 μ M DA en símil químico de orina

10

El pH del símil es de 6,2, y la composición química se indica a continuación:

Componente	mM
Urea	200
Ácido úrico	1
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	5
NaCl	54
KCl	30
NH ₄ Cl	15
CaCl ₂	3
MgSO ₄	2
NaHCO ₃	2
Na ₂ C ₂ O ₄	0.1
Na ₂ SO ₄	9
KH ₂ PO ₄	3.6
Na ₂ HPO ₄	0.4
FeSO ₄	0.005
Ácido láctico	1

En la Fig. 11 se muestra una ampliación de las voltamperometrías cíclicas en la zona de oxidación de la dopamina 10 μ M en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire. La Fig. 10 muestra las voltamperometrias cíclicas en el barrido completo. El potencial de oxidación de la

15

dopamina se encuentra entre 0.230-0.237V, mientras que el pico de oxidación de la urea y otros componentes se encuentra en 0.418-0.425V.

La Fig. 12 muestra la intensidad del pico de oxidación de la urea y otros compuestos frente a ciclos de oxidación y reducción en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire. El potencial de oxidación de la urea y otros compuestos se encuentra entre 0.418 y 0.425 V. El total de ciclos aplicados al sistema son 10. La pérdida de intensidad después de 10 ciclos de oxidación /reducción es aproximadamente del 18%.

10

La Fig. 13 muestra la intensidad del pico de oxidación de la dopamina frente a ciclos de oxidación y reducción en símil químico de orina empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire. El potencial de oxidación de la dopamina se encuentra entre 0.230 y 0.237V. El total de ciclos aplicados al sistema son 10. En este caso no hay pérdida de intensidad pero si un incremento del 25 % después de aplicar 10 ciclos de oxidación /reducción.

2 - GCE-LDPE con plasma: Estabilidad y detección 10 μ M DA en PBS

La Fig. 14 muestra una ampliación de las voltamperometrías cíclicas en la zona de oxidación de la dopamina 10 μ M en PBS 0.1M (buffer fosfato salino, pH 7.2) empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire. El recuadro insertado muestra las voltamperometrias cíclicas en el barrido completo. El potencial de oxidación de la dopamina se encuentra entre 0.171 y 0.174V.

25

La Fig. 15 muestra la intensidad del pico de oxidación de la dopamina frente a ciclos de oxidación y reducción en PBS 0.1M (buffer fosfato salino, pH 7.2) empleando un GCE recubierto con LDPE tratado con plasma-aire. El potencial de oxidación de la dopamina se encuentra entre 0.171 y 0.174V. El total de ciclos aplicados al sistema son 10. La pérdida de intensidad después de 10 ciclos de oxidación /reducción es aproximadamente del 17%.

30

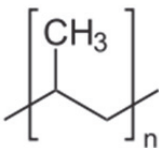
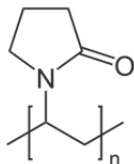
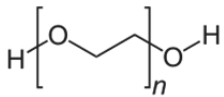
3 - Sustratos alternativos con polietileno

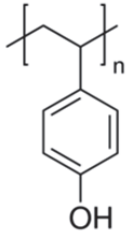
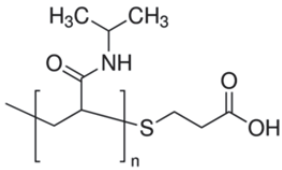
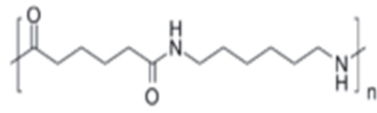
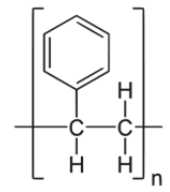
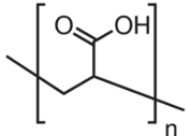
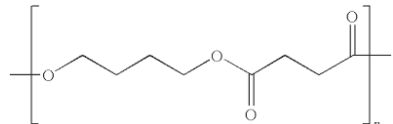
Se han probado sustratos de base inorgánica, es decir, no ricos en carbono (es decir, con menos de un 50% en peso de carbono respecto del peso total del sustrato).

- 5 Concretamente se han probado sustratos de ITO (óxido de indio y estaño, en inglés indium tin oxide) y de acero inoxidable AISI 316, en ambos casos recubiertos con polietileno de baja densidad. En ambos casos, los sustratos quedan afectados negativamente con la aplicación del plasma y no se obtienen resultados favorables.

10 4 - Polímeros alternativos

Se han ensayado otros polímeros convencionales, aplicados sobre un GCE, sin tratar con plasma y tratados con plasma en las mismas condiciones que LDPE, para la detección de 10µM DA en PBS. En la siguiente tabla se muestran los polímeros ensayados, indicándose el disolvente y cantidad de polímero utilizado en la preparación del film.

POLÍMERO	DISOLVENTE	CANTIDAD DE POLÍMERO (mg)
Polipropileno isotáctico 	o-diclorobenceno, 10mL	52.4
Polivinilpirrolidona 	cloroformo, 10mL	43
Poli(óxido de etileno) 	cloroformo, 10mL	43.6

Poli(4-vinilfenol) 	metanol, 4mL	11.8
Policaprolactona 	cloroformo, 10mL	46.5
Nailon 66 	ácido hidroclicórico , 10mL	43.5
Poliestireno 	cloroformo, 10 mL	33.5
Ácido poliacrílico 	agua	25 wt%
Poli(butilen succinato) 	Cloroformo/diclorometano (50/50), 10mL	47.6

En la siguiente tabla se muestran las intensidades, labs (absoluta, sin línea base) y lpeak (con línea base), y el potencial de oxidación obtenido en la detección de dopamina 10μM en PBS 0.1M para GCE recubierto con polímero convencional y tratado con plasma frío (atmósfera oxidante).

PLASMA	Dopamina 10µM		
	I _{peak} (µA)	I _{abs} (µA)	E _{ox} (V)
GCE - plasma	1.44E-01	3.12E-01	0.174
Poli(butilen succinato) - plasma	5.57E-02	2.49E-01	0.203
Polipropileno - plasma	1.14E-01	3.32E-01	0.174
Polivinilpirrolidona - plasma	1.14E-01	3.15E-01	0.174
Poli(óxido de etileno) – plasma	1.04E-01	2.17E-01	0.174
Poli(4-vinilfenol) - plasma	1.55E-01	3.81E-01	0.179
Policaprolactona - plasma	1.91E-01	3.88E-01	0.171
Nailon 66 - plasma	9.81E-02	1.96E-01	0.179
Poliestireno - plasma	1.21E-01	3.05E-01	0.184
Ácido poliacrílico – plasma	2.99E-02	1.89E-01	0.208

En las Figs. 16 a 27 se muestran los resultados obtenidos. Como puede verse, la aplicación de plasma-aire en otros polímeros convencionales produce efectos
5 similares a los obtenidos con LDPE.

5 - Atmósfera no oxidante

Se han realizado ensayos con atmósferas no oxidantes, concretamente con atmósfera
10 de N₂, con GCE recubierto de LDPE, obtenido de acuerdo con las condiciones anteriores.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 29 y en la tabla siguiente:

	Atmósfera oxidante	Atmósfera no oxidante
Potencial de oxidación (V)	0.174	0.171
Intensidad del pico (µA)	2.03E-1	1.09E-1
Intensidad absoluta (µA)	6.27E-1	6E-1

15

Como puede verse, la utilización de atmósfera no oxidante en la aplicación del plasma frío produce efectos similares a los descritos con atmósfera oxidante.

Cuarta parte

La monitorización de los niveles de glucosa en el cuerpo humano es fundamental para el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes, que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Además, la monitorización del metabolismo de la glucosa a través de la detección de cambios en la concentración de este analito puede mejorar el tratamiento de enfermedades cerebrales, como por ejemplo los tumores y los traumatismos cerebrales. La detección de glucosa también es muy importante en la industria del procesado de comida, la fermentación y las células de bio-combustible.

Otro de los resultados sorprendentes de la presente invención es la la preparación de sensores electroquímicos de glucosa mediante la aplicación del tratamiento de superficie de plasma frío (plasma de corona en atmósfera ambiental a aproximadamente $0,5 \text{ J/cm}^2$ durante 2 minutos) a películas de polímero depositadas sobre un CGE.

La detección selectiva y simultánea de DA, UA (ácido úrico) y AA (ácido ascórbico) utilizando PNCPy es difícil porque los picos de oxidación de cada una de estas sustancias orgánicas son débiles y están parcialmente solapados entre sí mientras que, por contra, los picos de oxidación están bien resueltos cuando se emplean electrodos recubiertos con PEDOT. El comportamiento de PNMPy mejora cuando la película está recubierta con nanopartículas de oro (AuNPs), lo cual demuestra la actividad electrocatalítica promovida por estas últimas. En contraposición, las propiedades de los electrodos PEDOT para la detección selectiva de DA permanecen prácticamente inalteradas tras la incorporación de AuNPs.

Se modificaron tanto las películas de PEDOT como las de PNCPy generadas por polimerización anódica sobre un electrodo de CGE mediante la aplicación del tratamiento de superficie de plasma frío (plasma de corona en atmósfera ambiental a aproximadamente $0,5 \text{ J/cm}^2$ durante 2 minutos). Los ensayos de detección de glucosa en ausencia y presencia de interferentes (DA, UA y AA 1 mM) se llevaron a cabo mediante cronopotenciometría a temperatura ambiente. Las Figs. 29 a 30 muestran la

- respuesta cronopotenciométrica de los GCE recubiertos con PEDOT tratados con plasma. Tal como puede observarse, los electrodos tratados con plasma son capaces de detectar selectivamente la oxidación de la glucosa. En la Fig. 31 se muestra la determinación del límite de detección de glucosa del GCE recubierto con PEDOT y
- 5 con un tratamiento con plasma frío mediante cronopotenciometria. Los resultados se derivaron de la inyección estándar y sucesiva de glucosa. El límite de detección, que se determinó utilizando la recta de calibración para obtenida para una concentración máxima de glucosa 14 mM fue de 1 mM.
- 10 En conclusión, se han descrito unos procedimientos muy simples para la detección electroquímica de, por ejemplo, DA o glucosa. Dichos procedimientos han dado como resultado sensores con resolución y sensibilidad similares a los conseguidos mediante modificaciones químicas sofisticadas, tales como, por ejemplo, la incorporación de AuNPs a recubrimientos de CP, la preparación de compuestos multicapa de CP o la
- 15 funcionalización de monómeros. Además, se ha constatado que estos nuevos procedimientos tenían éxito cuando se aplicaba no únicamente a los CP, sino también a las capas de otros polímeros no activos electroquímicamente, como por ejemplo el LDPE. Esto abre las puertas a una vía rápida, fácil y simple de fabricar detectores, por ejemplo de DA, de glucosa, etc., sensibles que puedan ser implantados como tests de
- 20 diagnóstico muy económicos.

REIVINDICACIONES

1 – Procedimiento de recubrimiento de un sensor electroquímico caracterizado porque comprende las etapas de:

5

- recubrir un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del peso total del sustrato, con un polímero orgánico,
- aplicar a dicho recubrimiento un tratamiento con plasma frío.

10

2 – Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho plasma es un plasma atmosférico.

3 – Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho plasma es un plasma en vacío.

15

4 – Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho plasma es un plasma de corona de energía comprendida entre $0,1 \text{ mJ/cm}^2$ y 100 J/cm^2 en una atmósfera con oxígeno o nitrógeno u otro gas inerte.

20

5 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es un polímero no activo electroquímicamente.

6 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es polietileno.

25

7 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es poli(tetrametilen-succinato).

8 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es polipropileno.

30

9 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es polivinilpirrolidona.

10 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por
5 que el polímero orgánico es polióxido de etileno.

11 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es poli(4-vinilfenol).

10 12 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es policaprolactona.

13 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es la poliamida PA 66.

15

14 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es poliestireno.

15 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por
20 que el polímero orgánico es ácido poliacrílico.

16 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es celulosa.

25 17 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es un polímero electroquímicamente activo.

18 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es poli(3,4-etilendioxitiofeno).

30

19 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polímero orgánico es poli(*N*-cianoetilpirrol).

20 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado por que el tiempo de aplicación del plasma es mayor de 1 s, preferentemente mayor de 15 s.

5 21 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado por que el tiempo de aplicación del plasma es menor de 120 s.

22 – Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado por que el sustrato rico en carbono es de un material del grupo formado por grafito,
10 carbono vítreo, carbonos nanoestructurados, dichos carbonos nano estructurados siendo preferentemente grafeno o nanotubos de carbono, y fulerenos.

23 – Procedimiento de fabricación de un sensor electroquímico, que comprende un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso
15 respecto del peso total del sustrato, caracterizado por que comprende una etapa de recubrimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

24 – Sensor electroquímico caracterizado por que comprende un sustrato rico en carbono, con un contenido en carbono superior o igual al 50% en peso respecto del
20 peso total del sustrato, y un recubrimiento polimérico orgánico modificado, donde dicho recubrimiento polimérico modificado es obtenible mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

25 – Uso de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para la
25 fabricación de un sensor electroquímico.

26 – Uso según la reivindicación 25, caracterizado por que dicho sensor es para la detección de dopamina.

30 27 – Uso según la reivindicación 25, caracterizado por que dicho sensor es para la detección de glucosa.

28 – Uso según la reivindicación 25, caracterizado por que dicho sensor es para la detección de ácido úrico.

5 29 – Uso según la reivindicación 25, caracterizado por que dicho sensor es para la detección de ácido ascórbico.

30 – Uso de un sensor según la reivindicación 24 para la detección de dopamina.

10 31– Uso de un sensor según la reivindicación 24 para la detección de glucosa.

32 – Uso de un sensor según reivindicación 24 para la detección de ácido úrico.

33 – Uso de un sensor según la reivindicación 24 para la detección de ácido ascórbico.

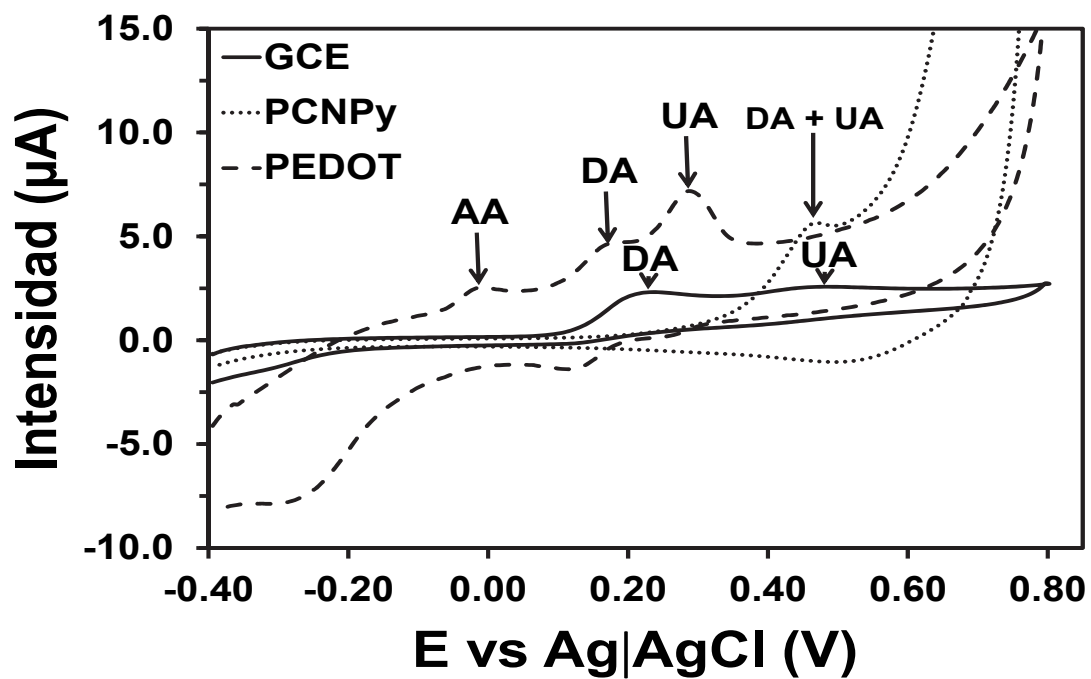


Fig. 1

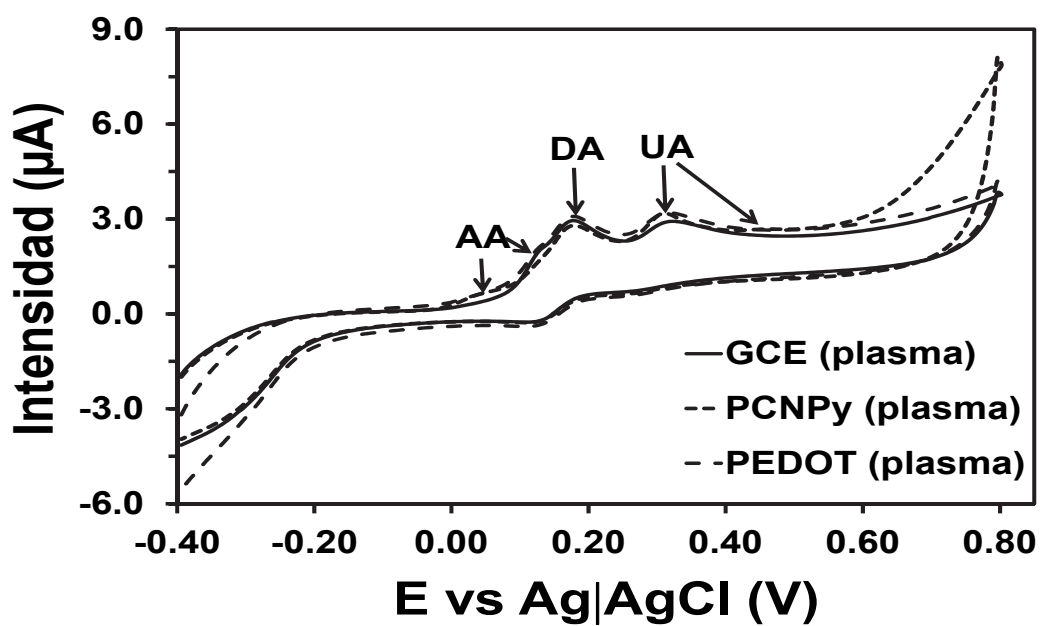


Fig. 2

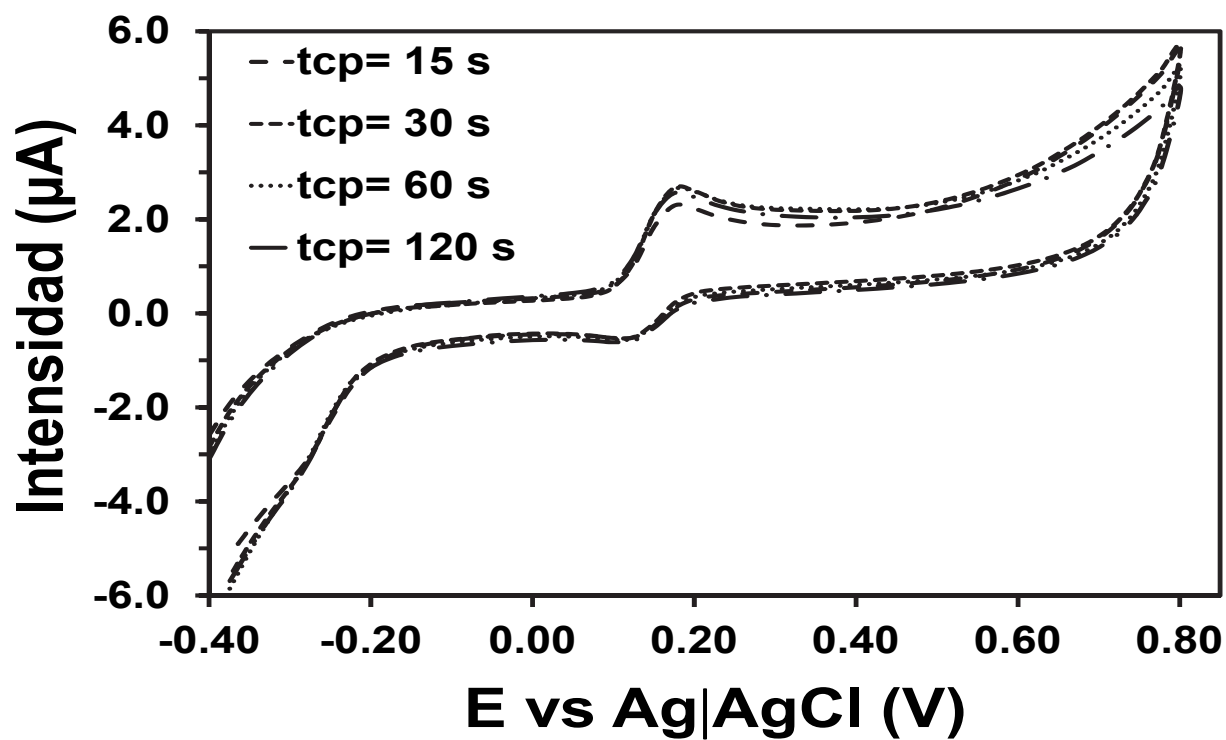


Fig. 3

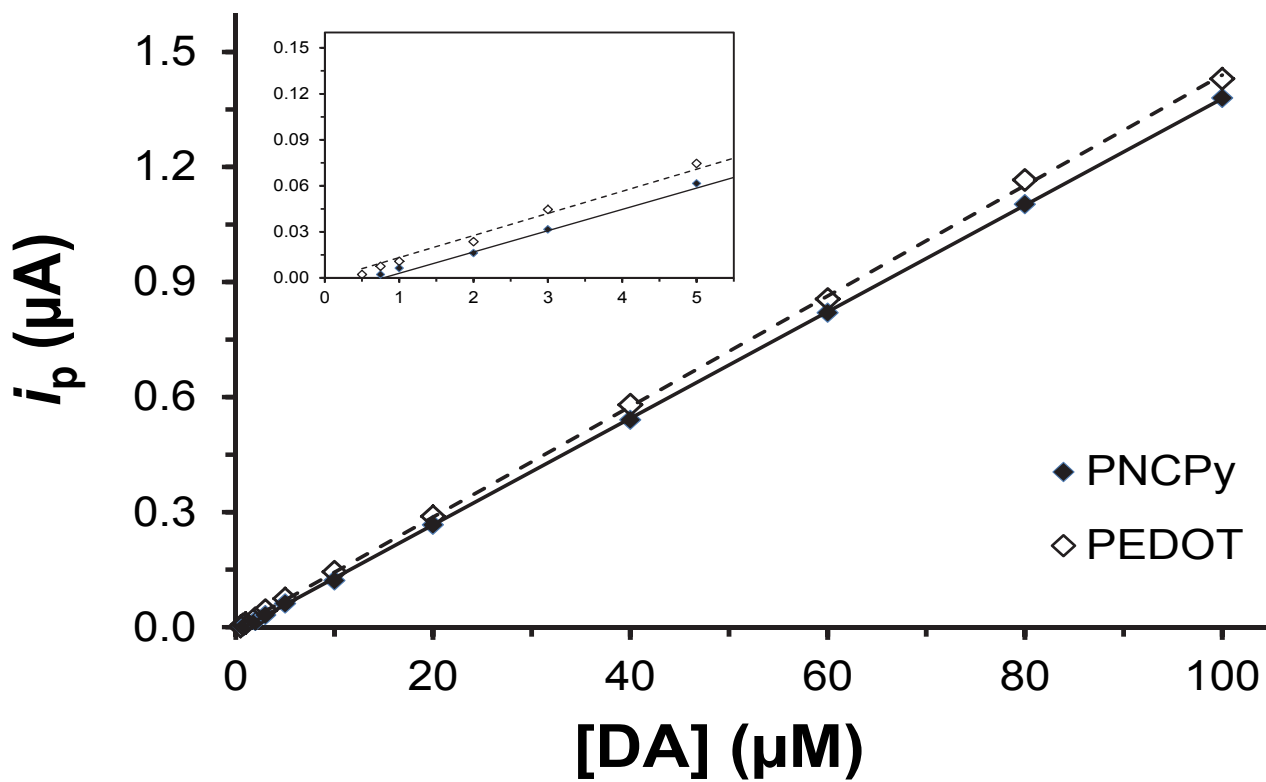


Fig. 4

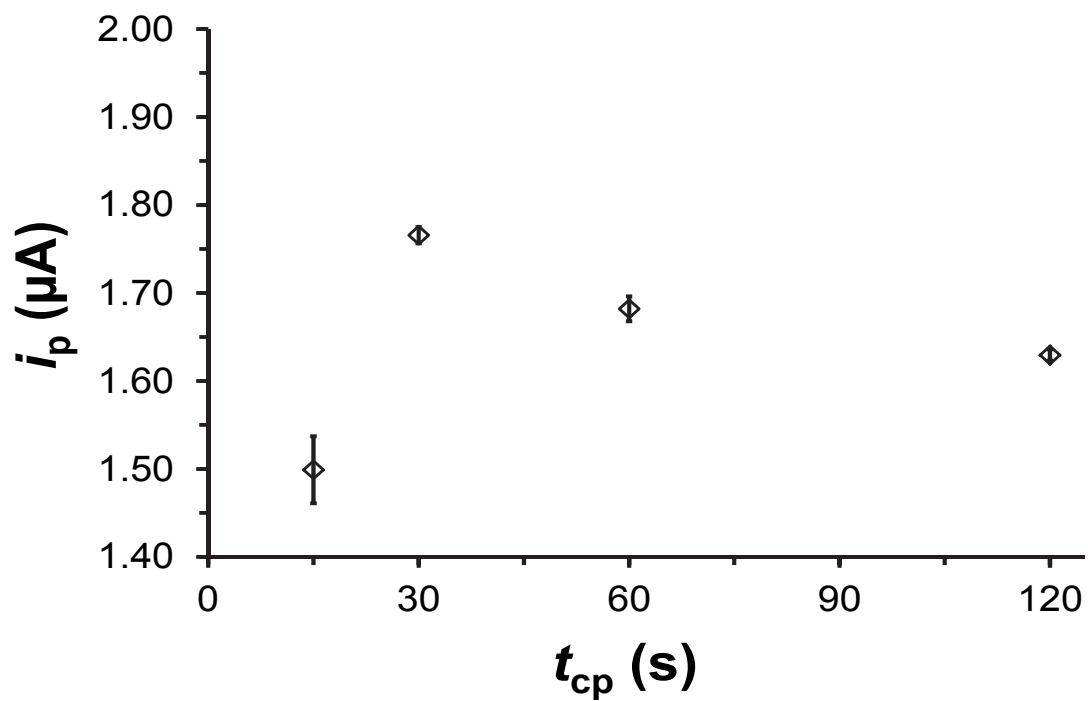


Fig. 5

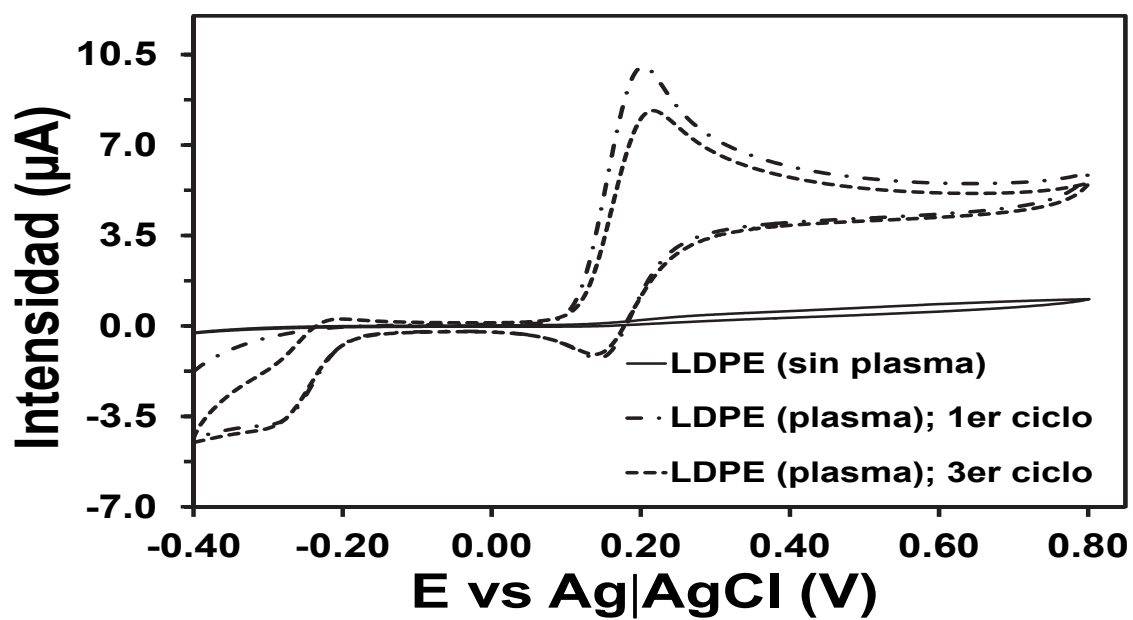


Fig. 6

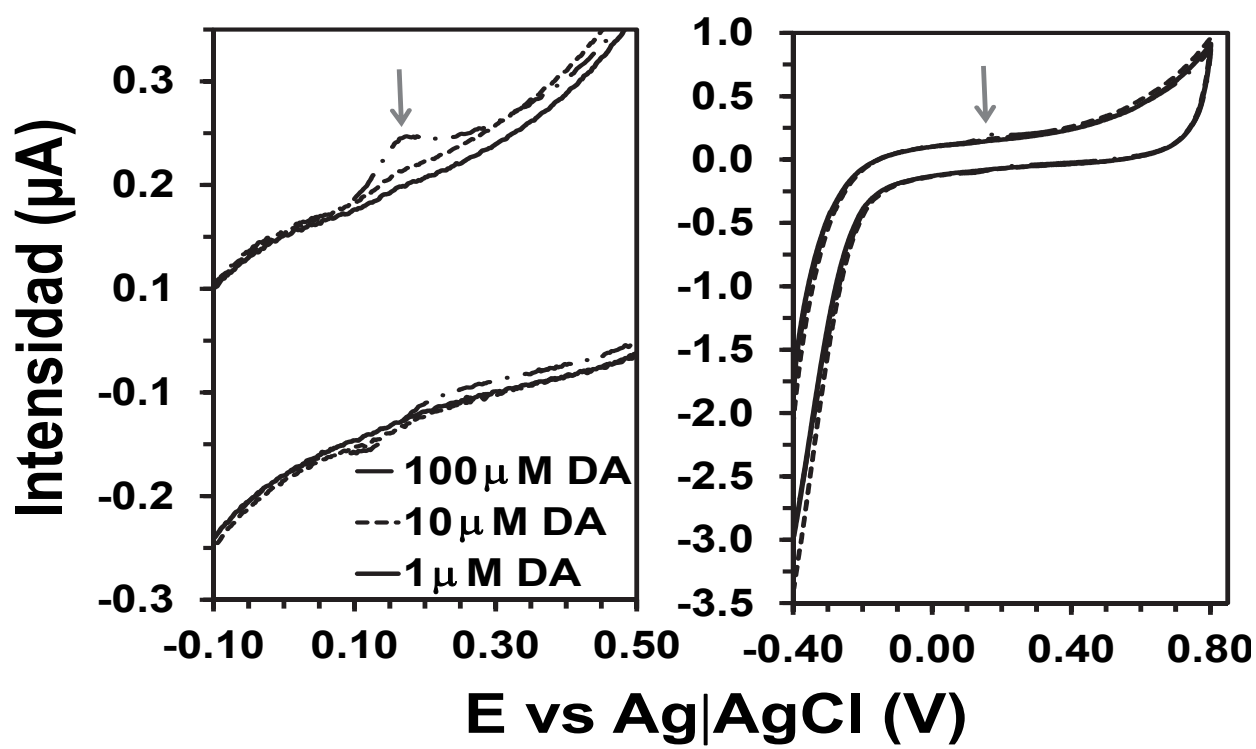


Fig. 7

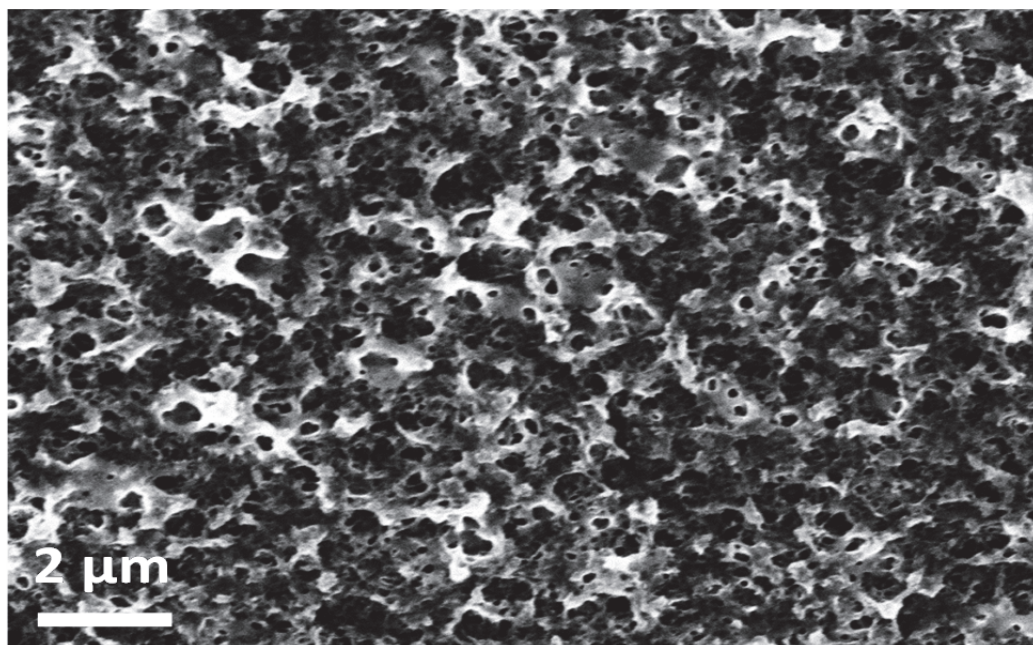


Fig. 8

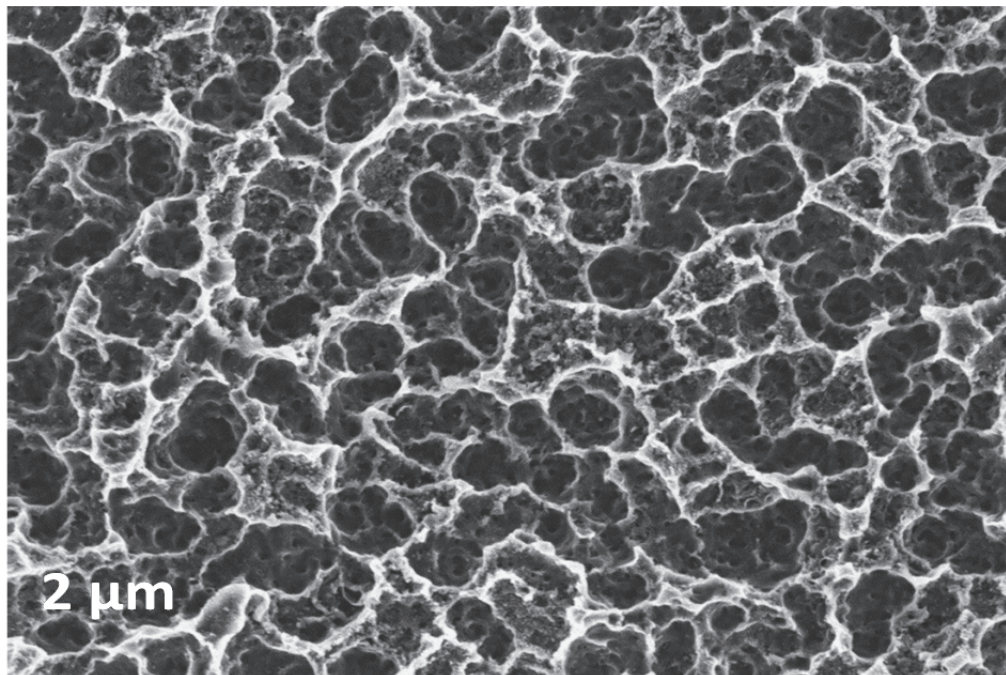


Fig. 9

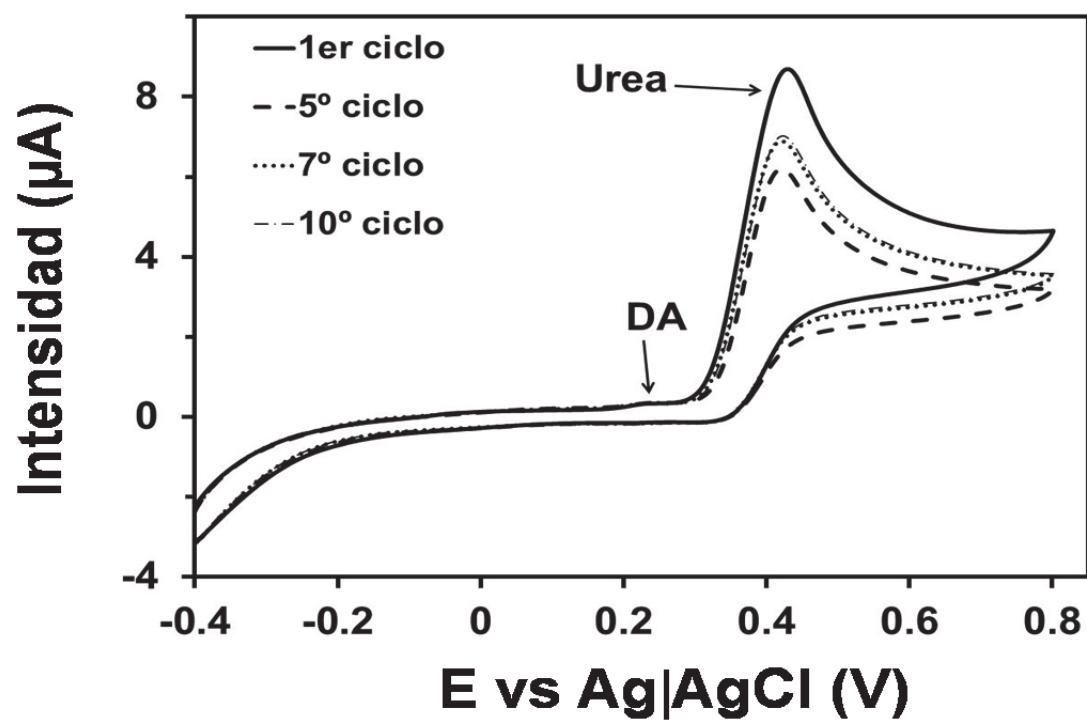


Fig. 10

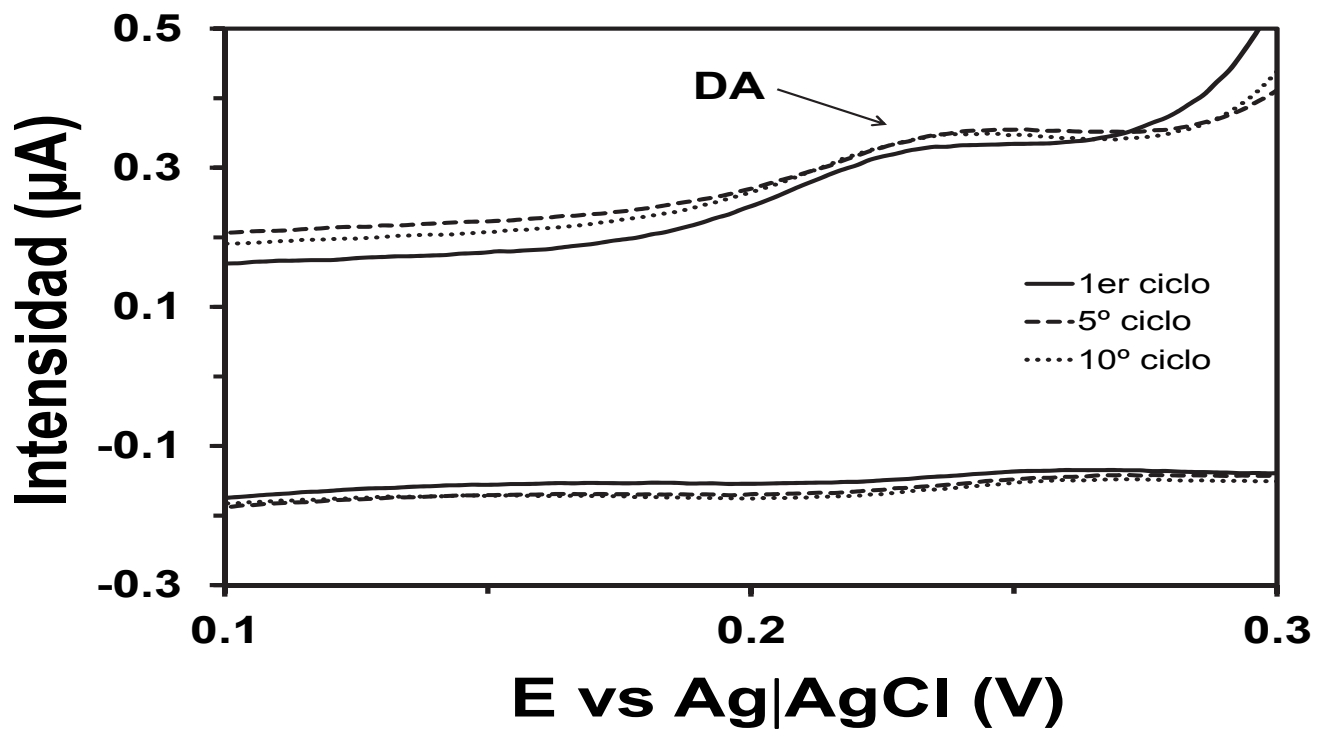


Fig. 11

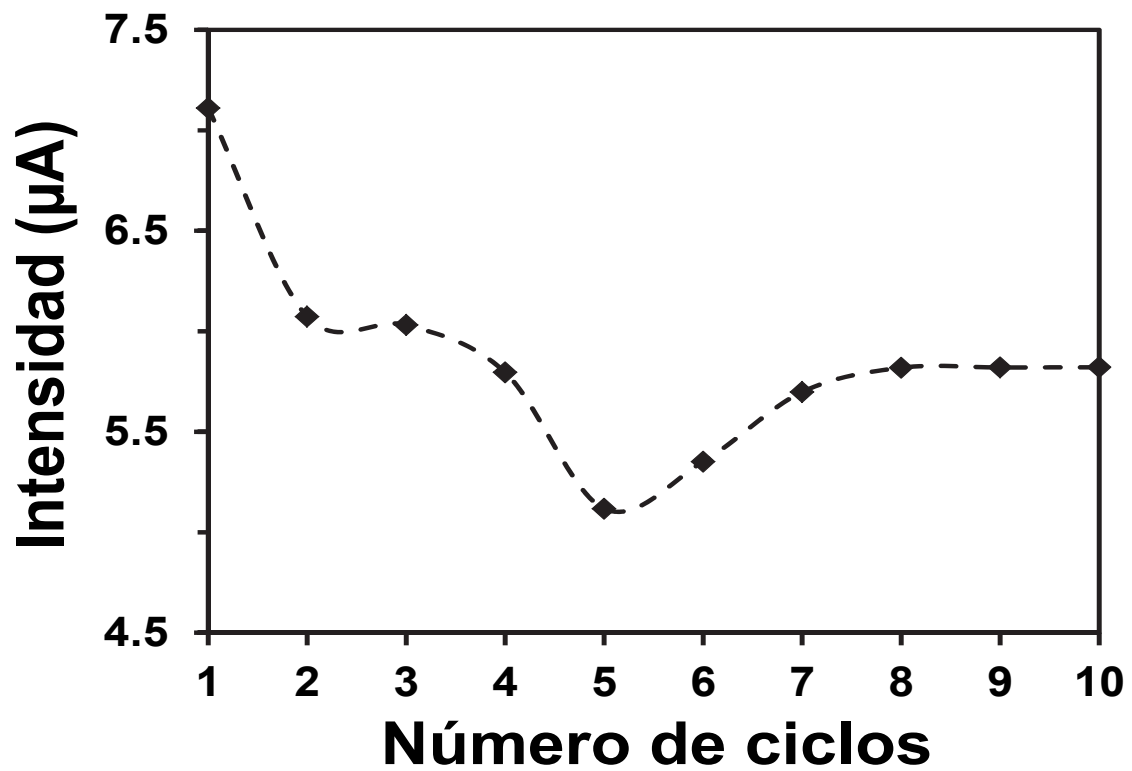


Fig. 12

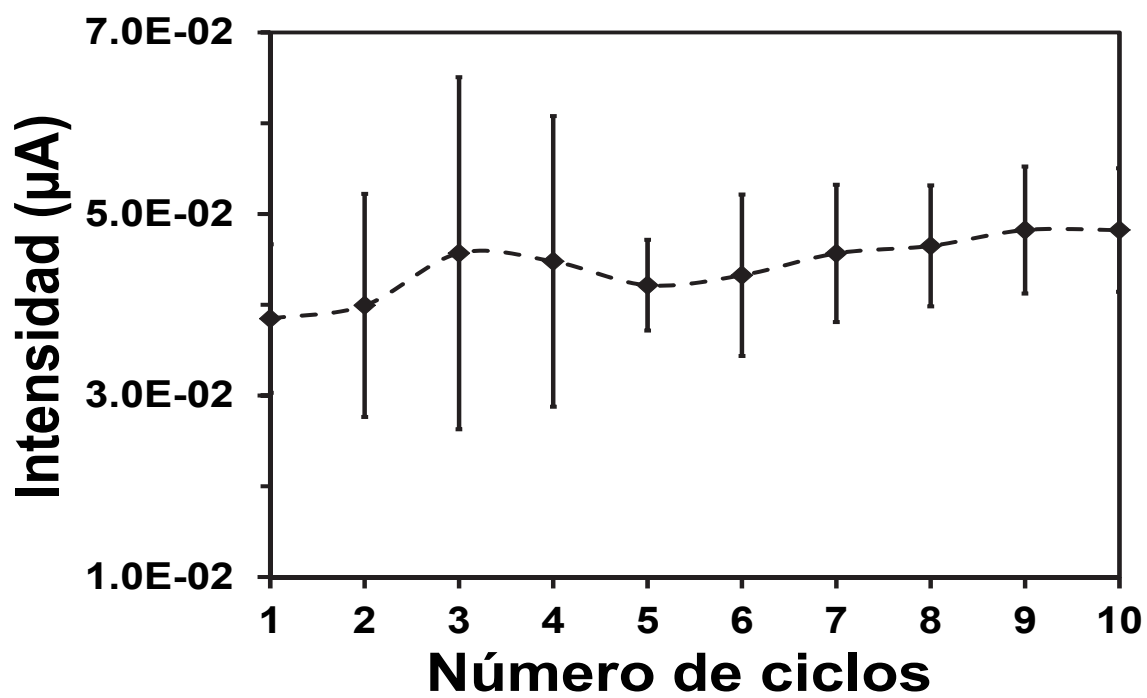


Fig. 13

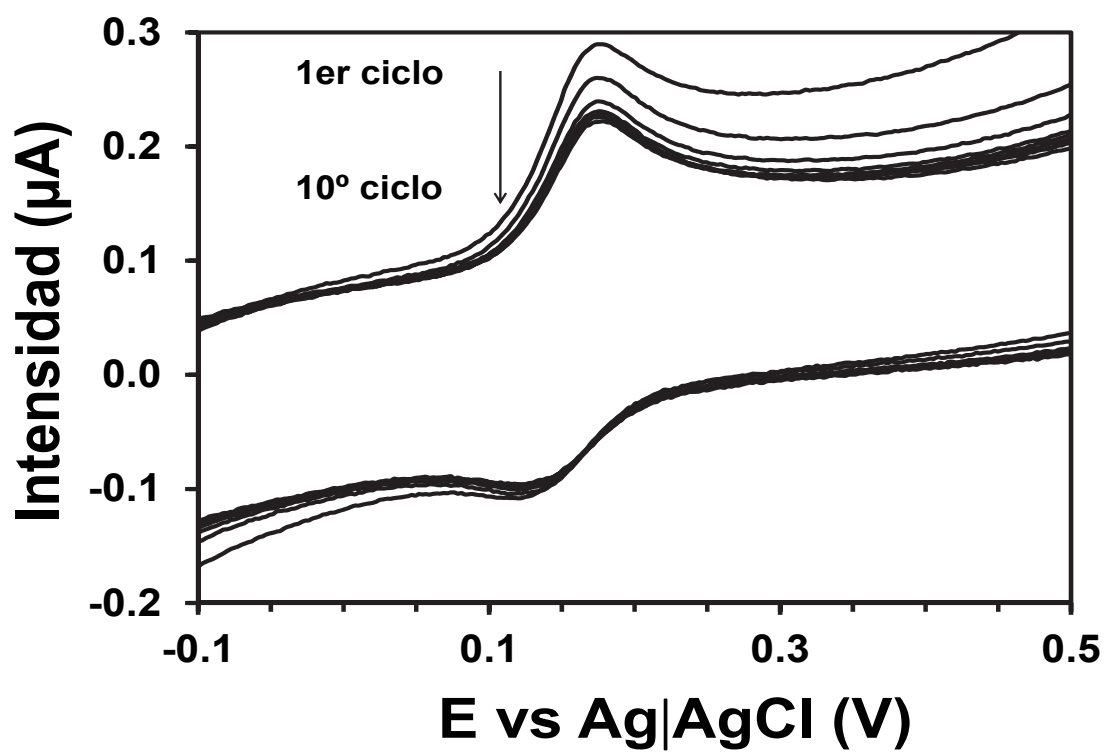


Fig. 14

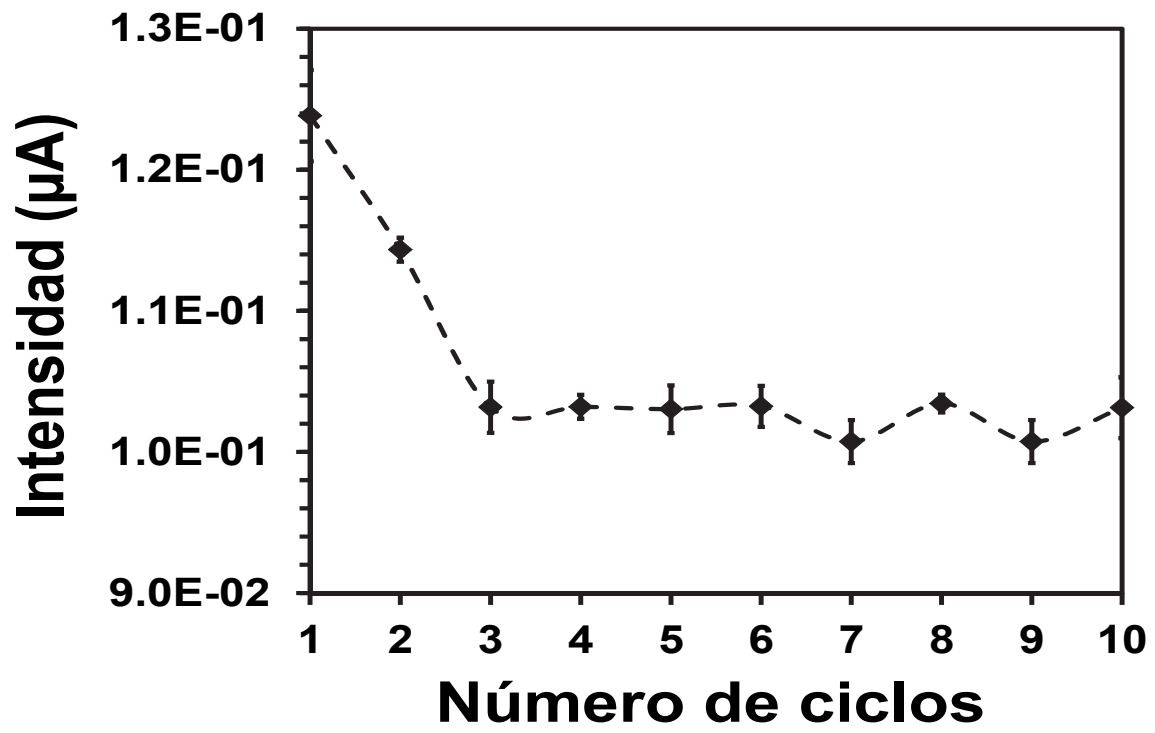


Fig. 15

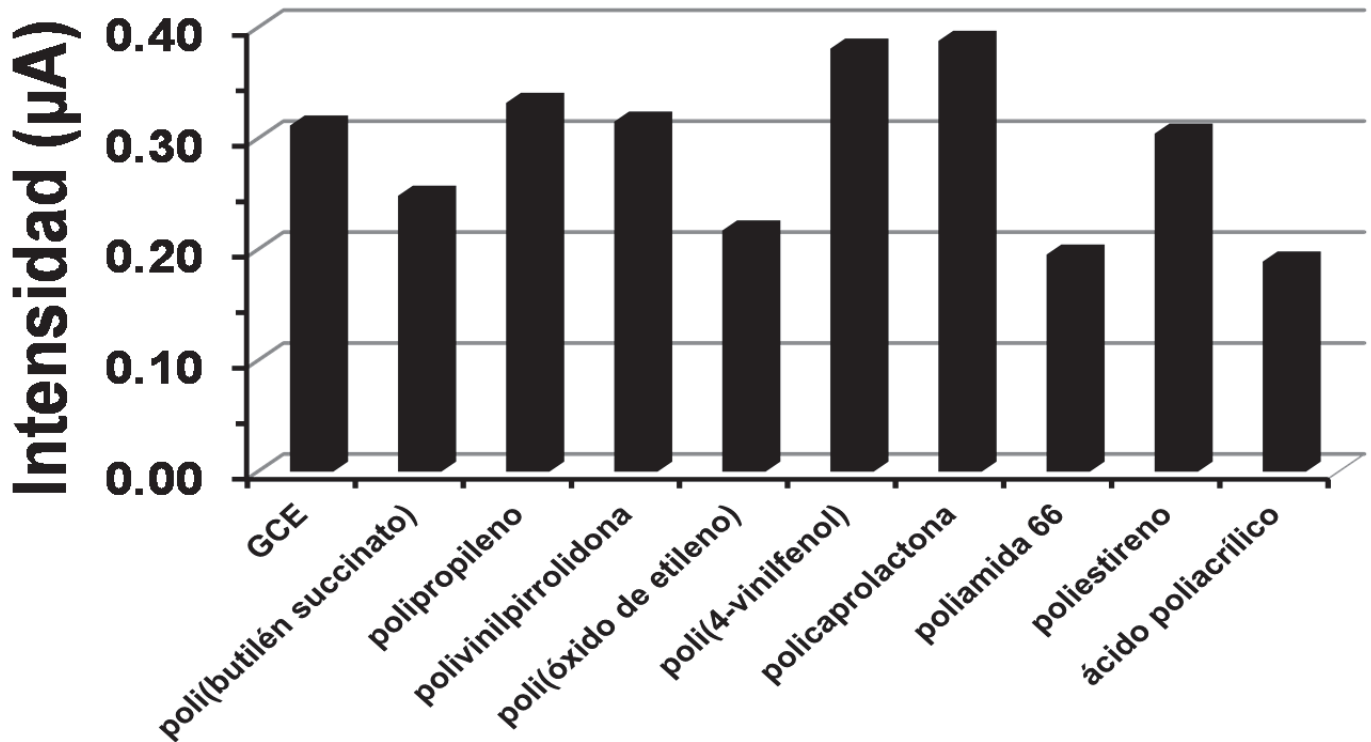


Fig. 16

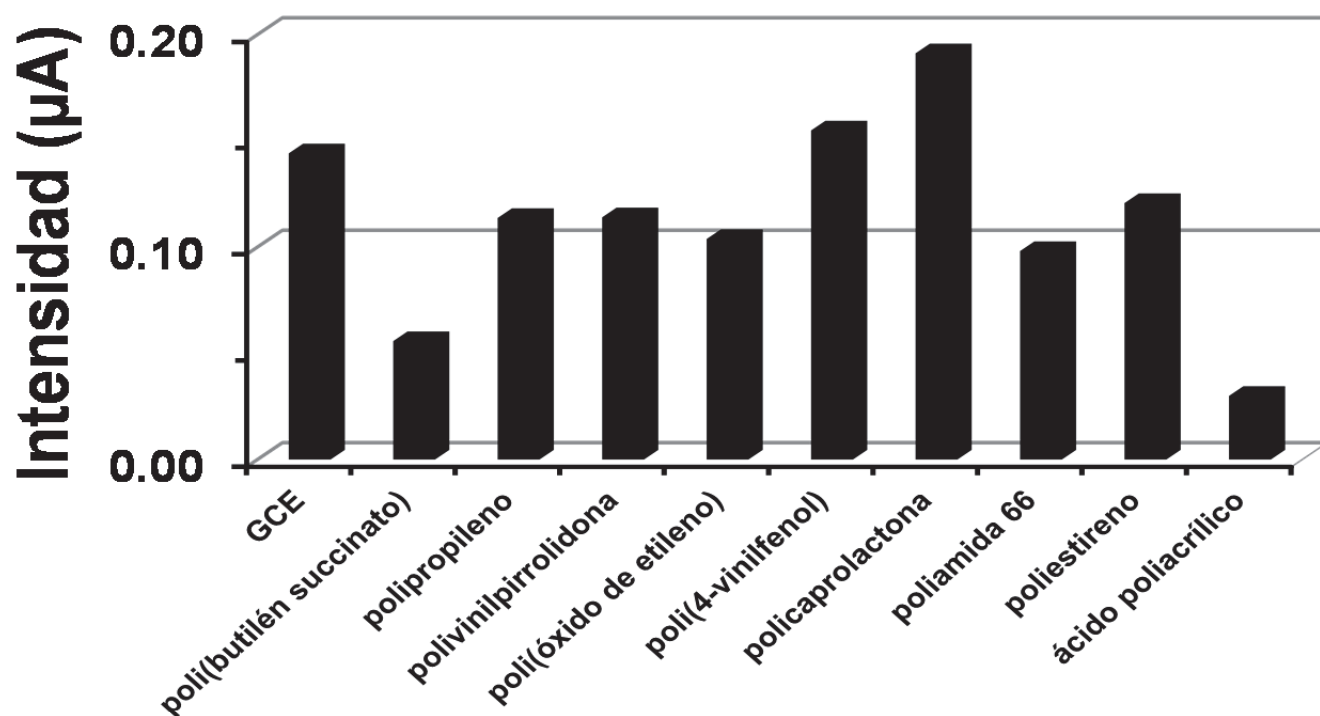


Fig. 17

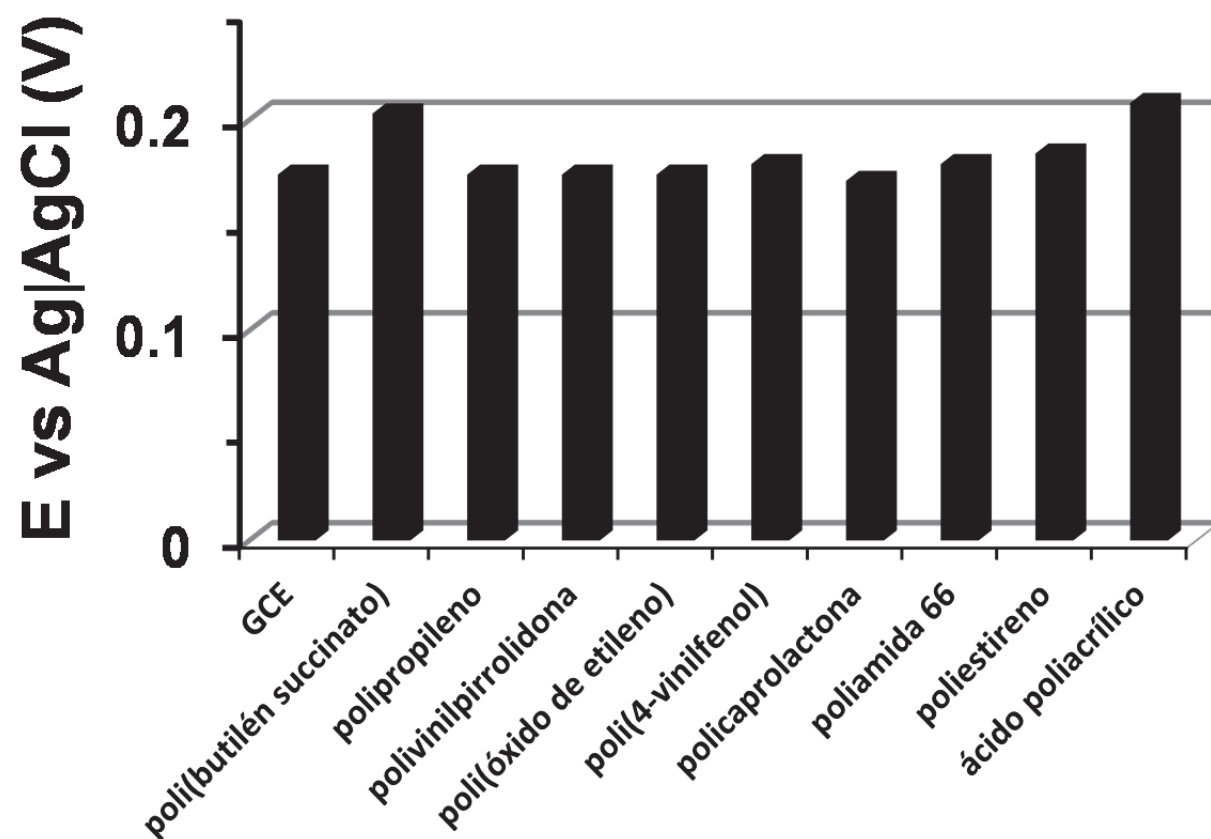


Fig. 18

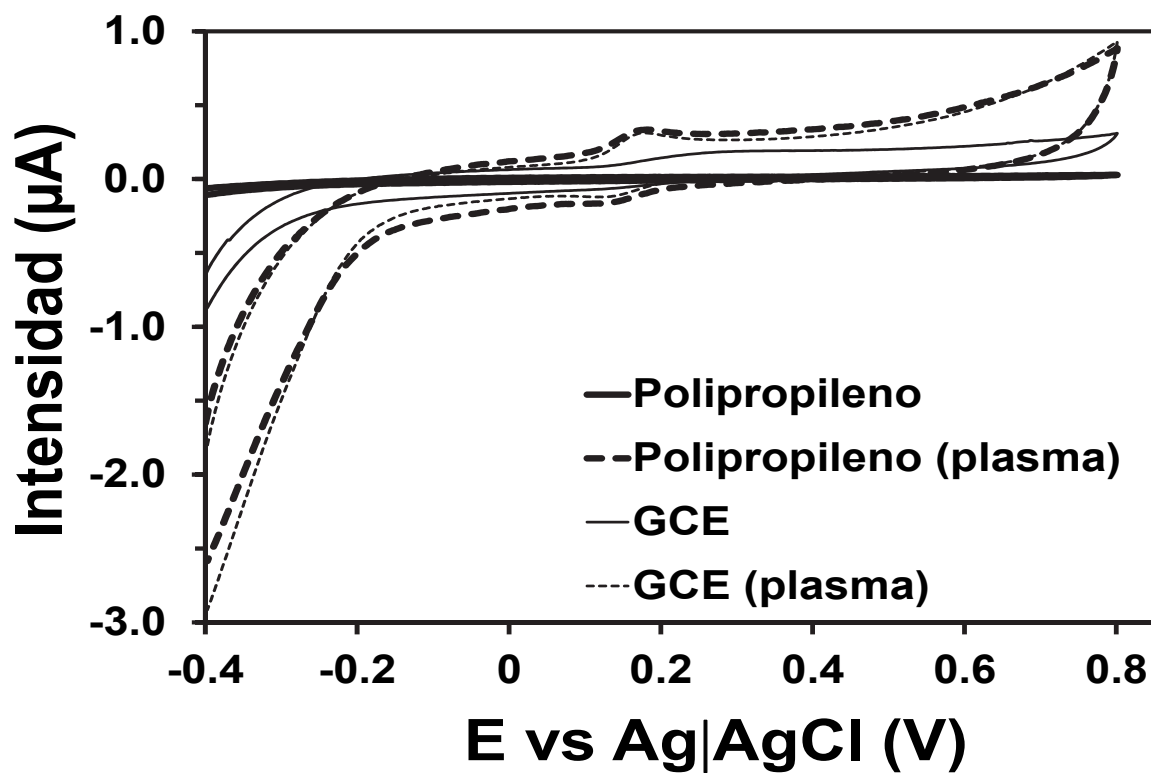


Fig. 19

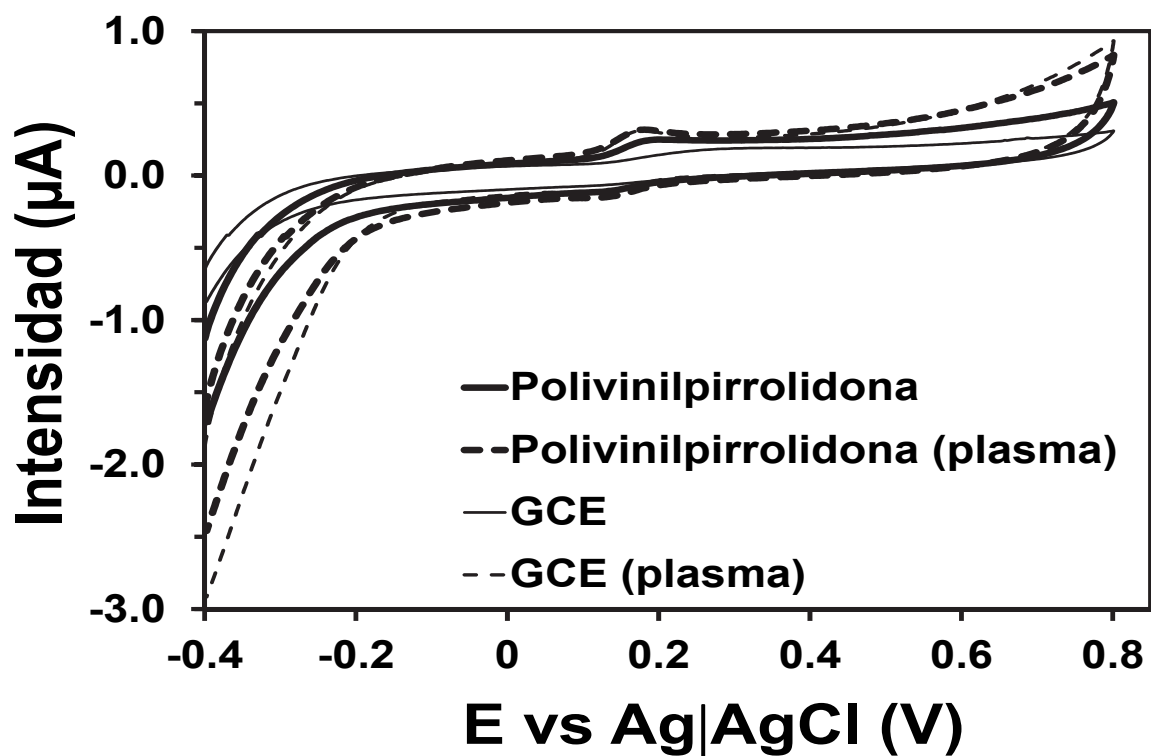


Fig. 20

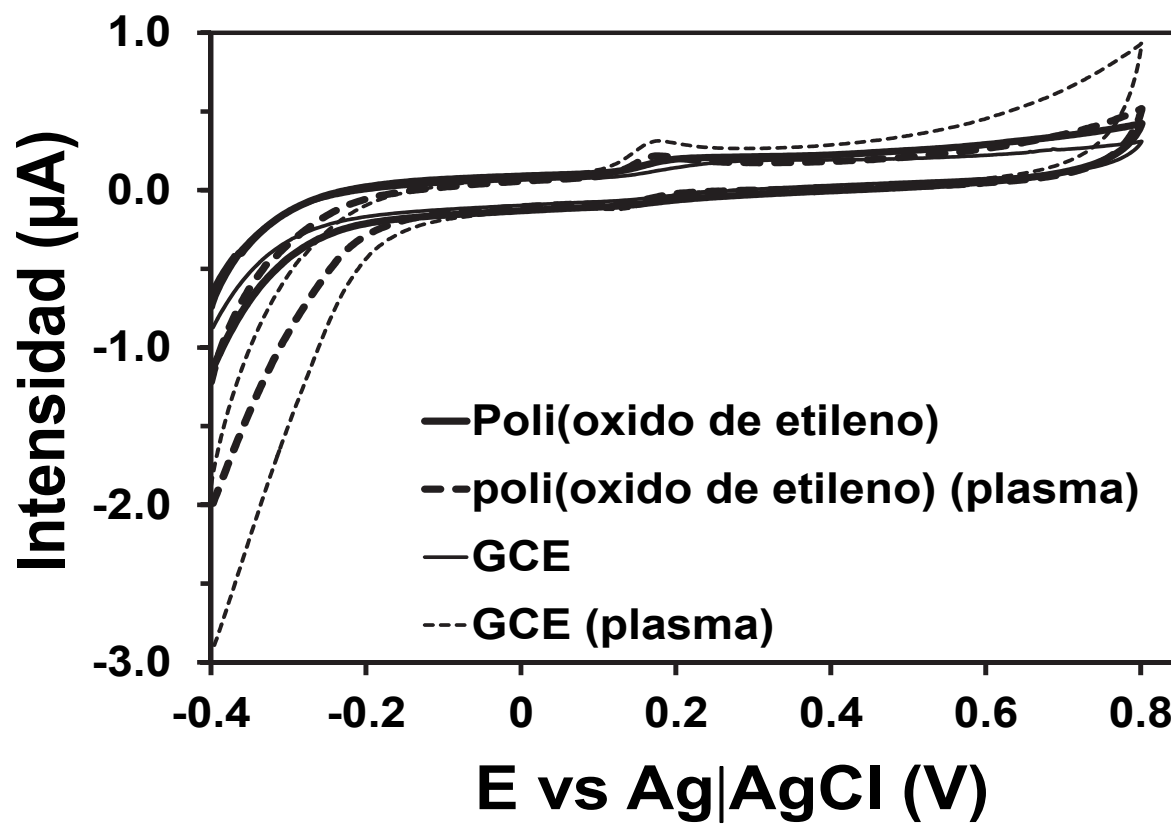


Fig. 21

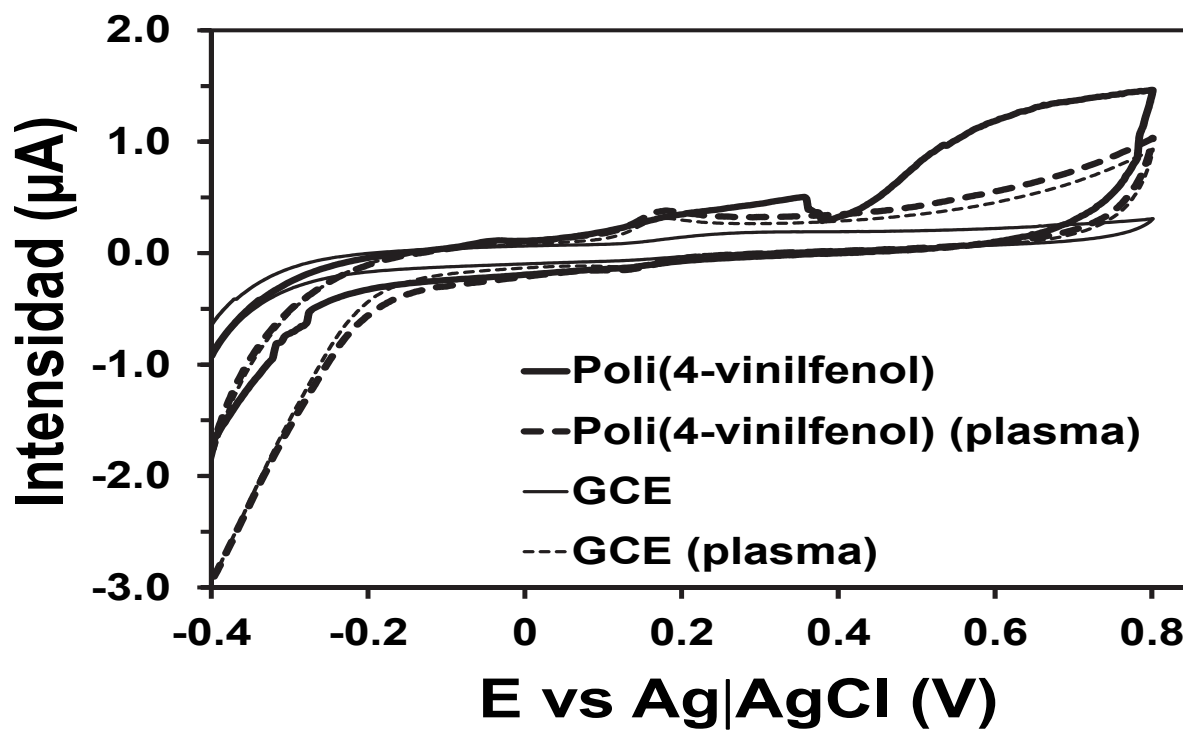


Fig. 22

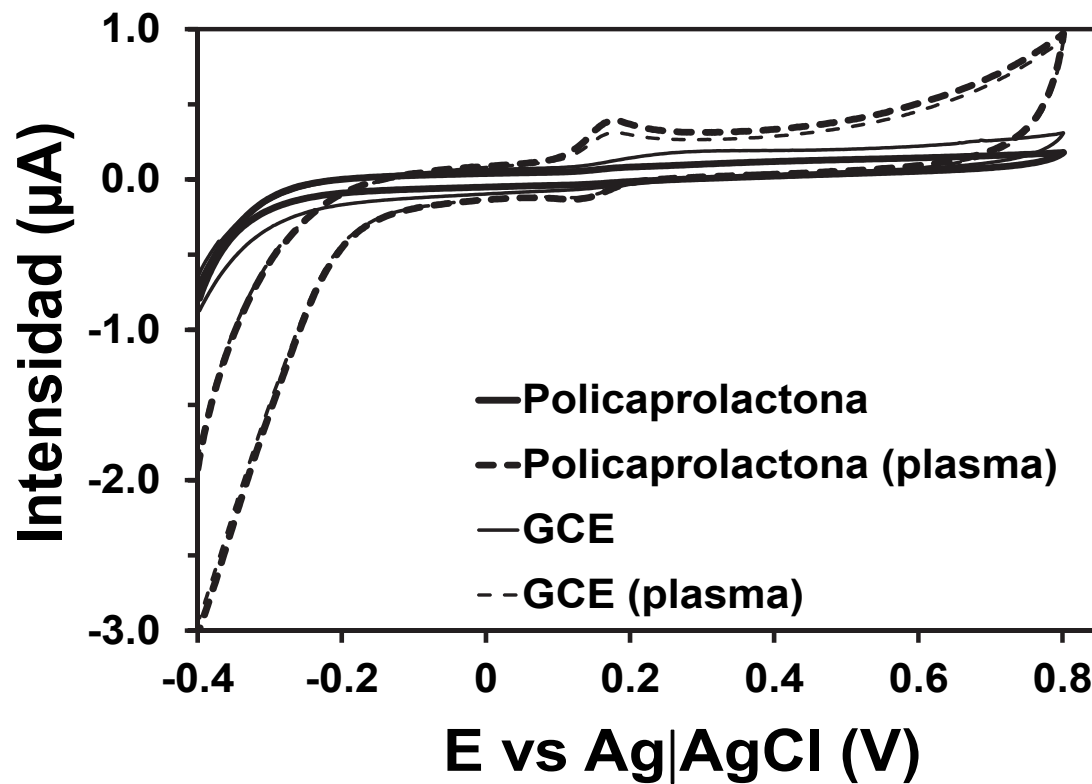


Fig. 23

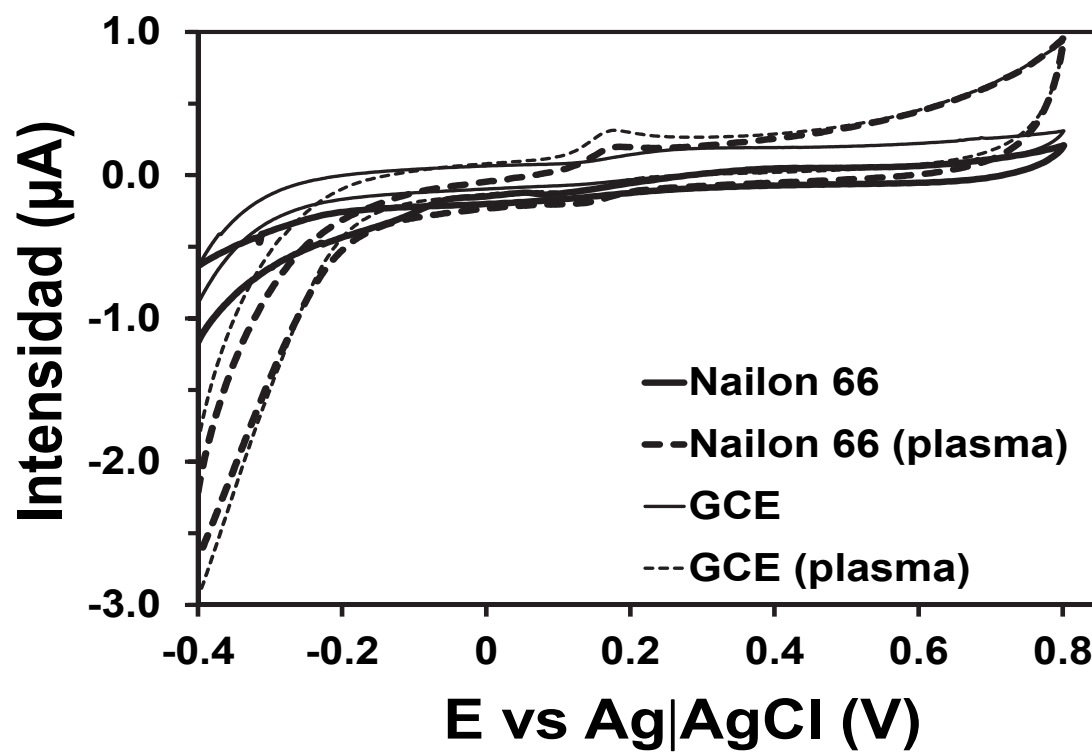


Fig. 24

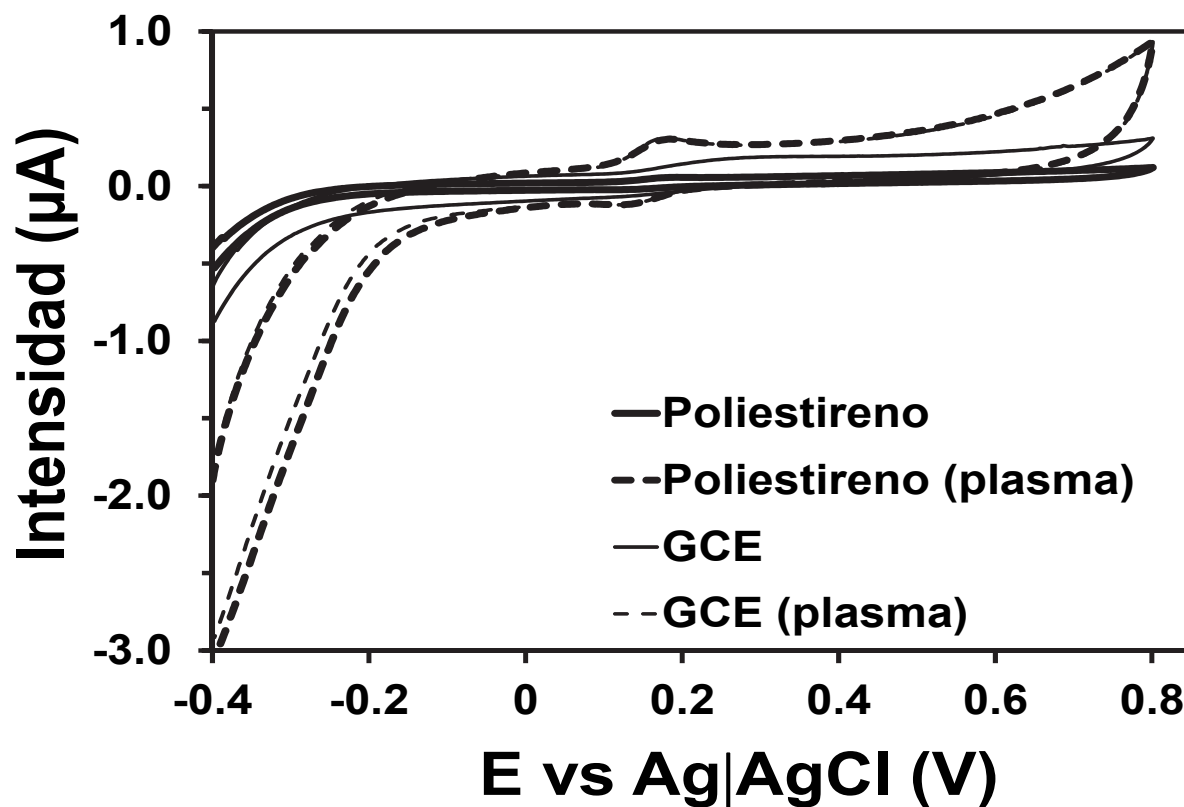


Fig. 25

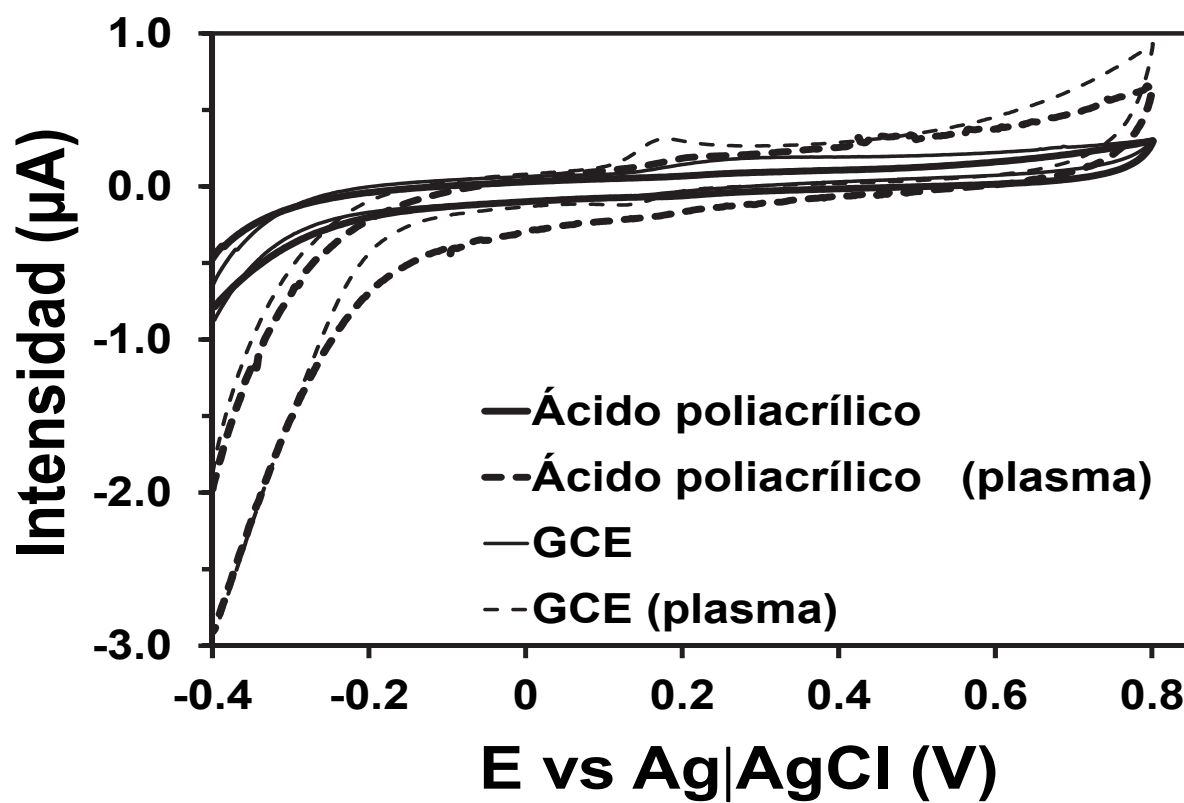


Fig. 26

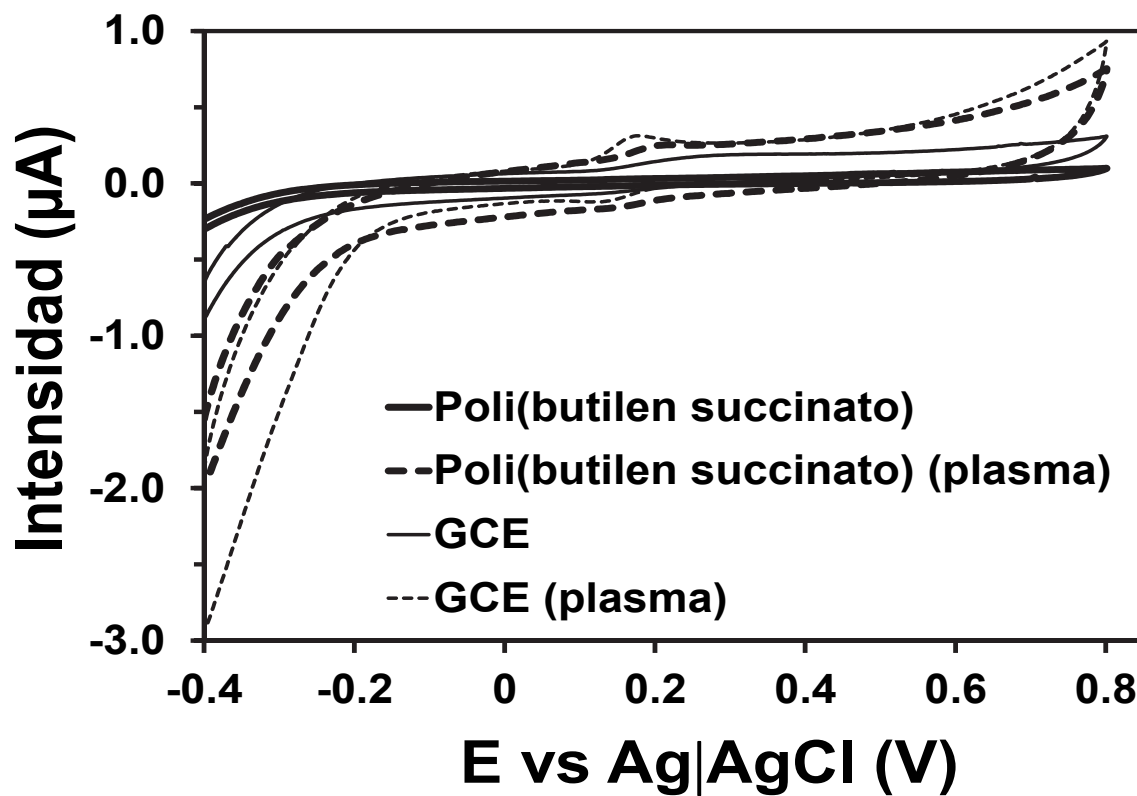


Fig. 27

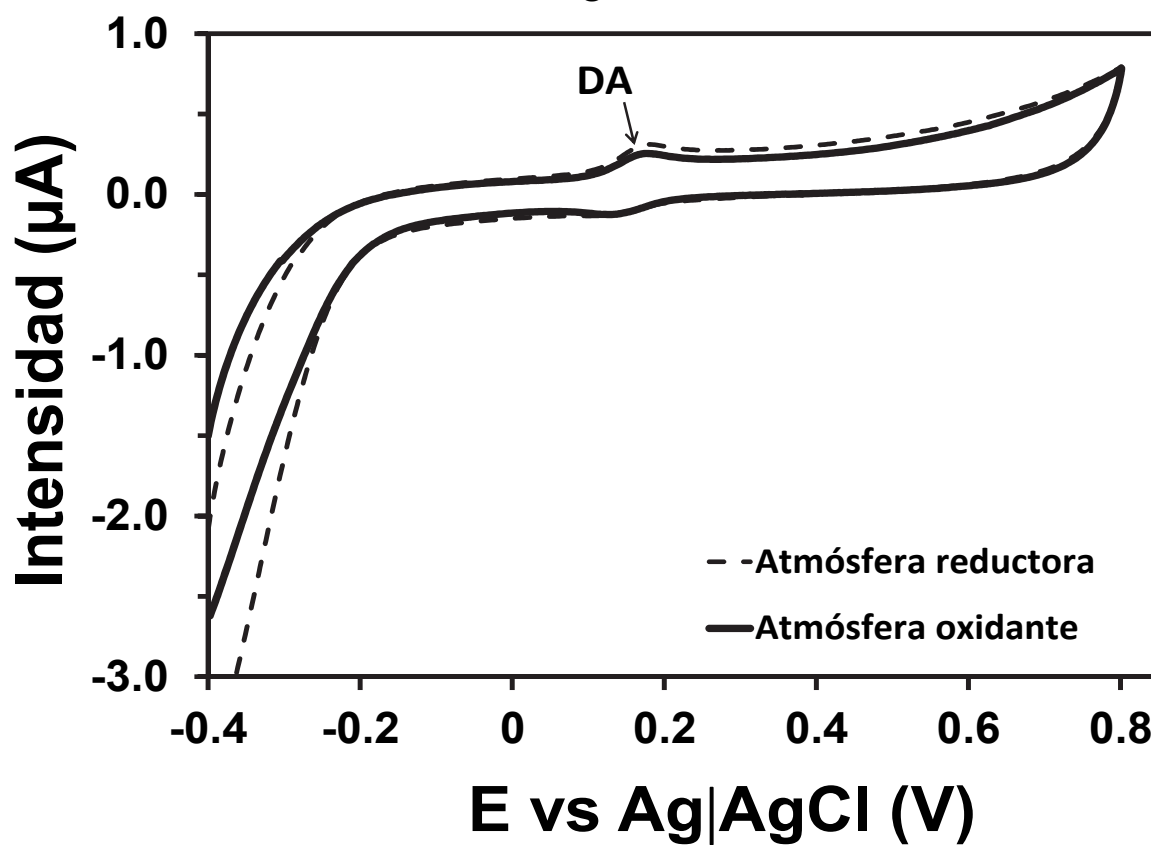


Fig. 28

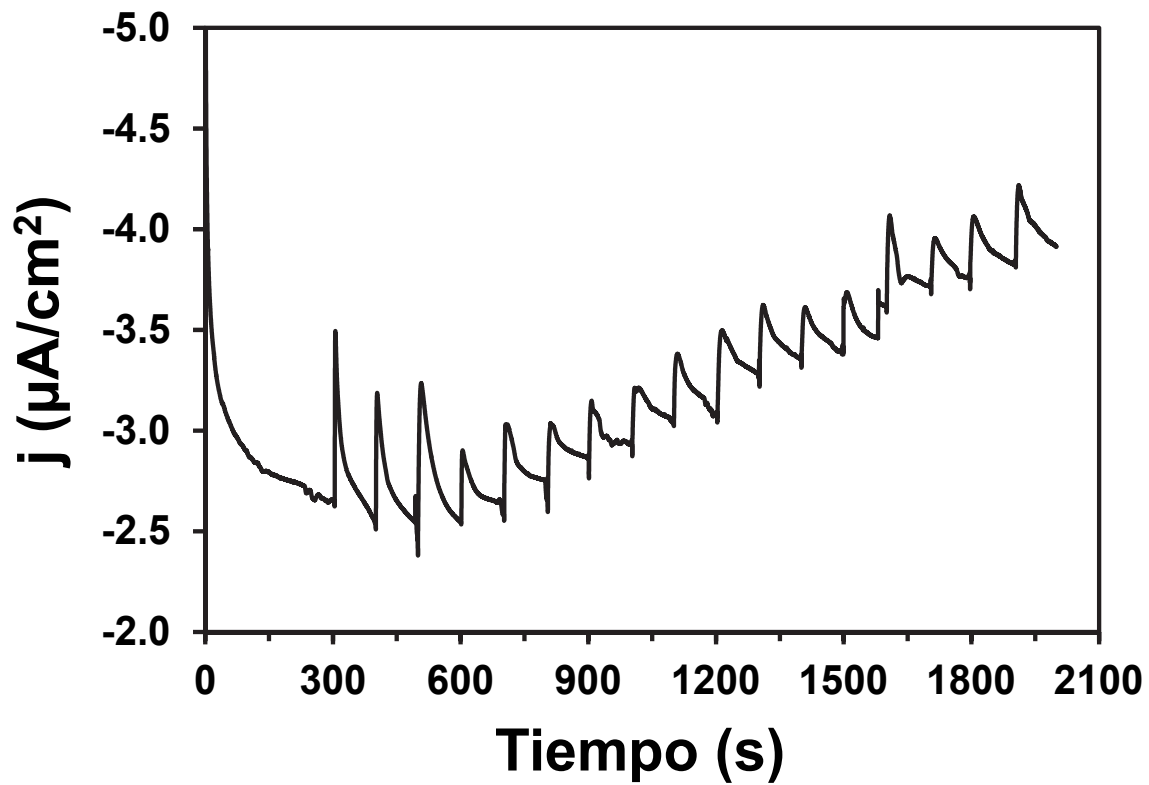


Fig. 29

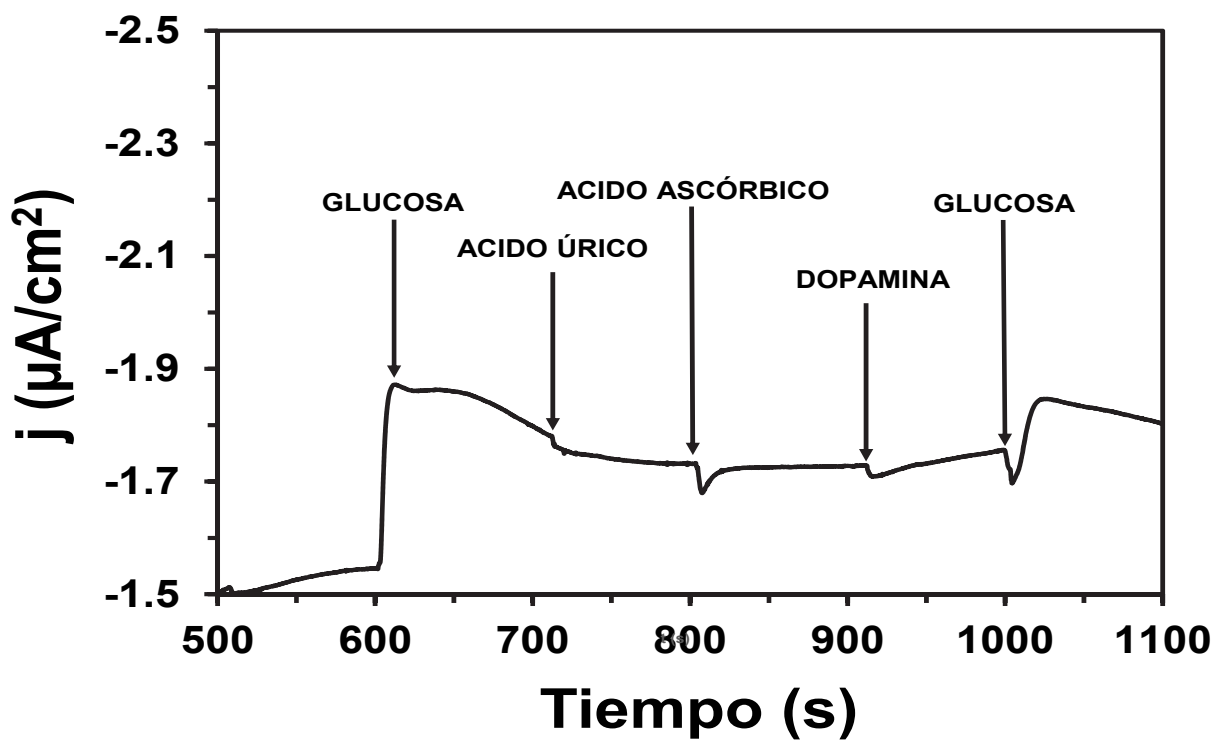


Fig. 30

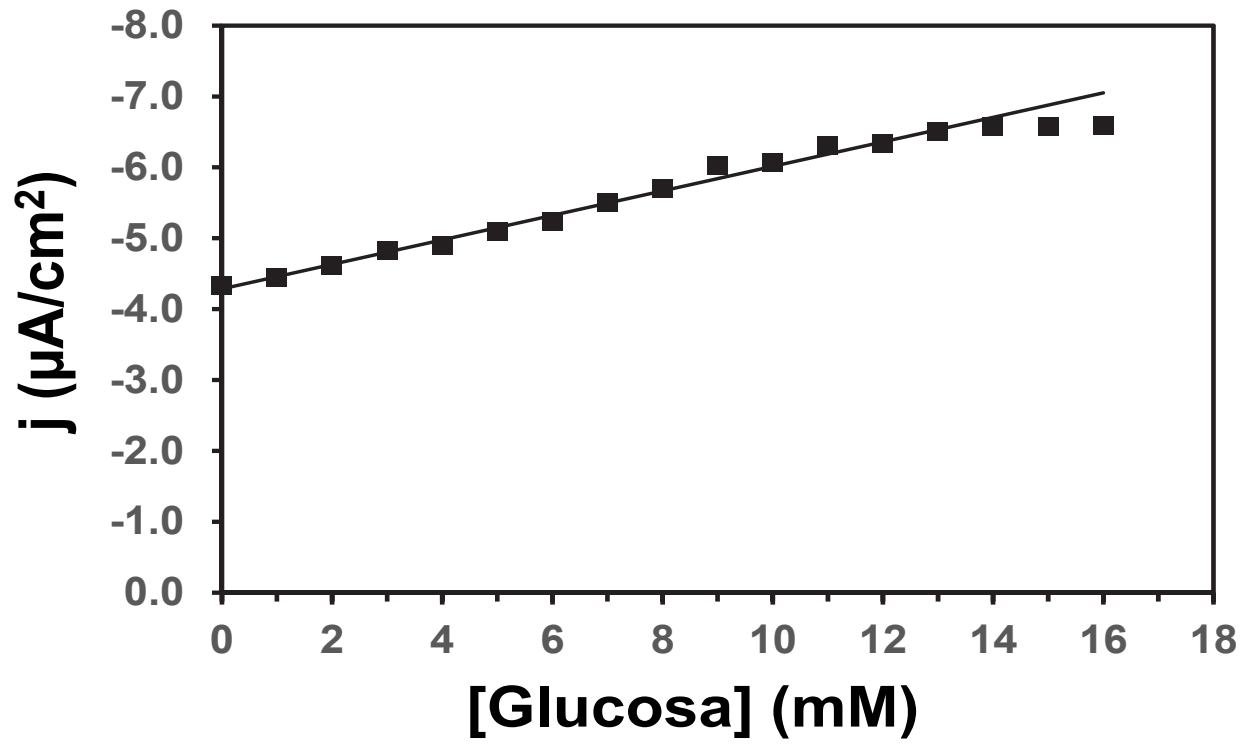


Fig. 31



- (21) N.º solicitud: 201531868
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2015
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	J. ZHAO et al., "Carbon nanotube nanoweb-bioelectrode for highly selective dopamine sensing", Applied Materials & Interfaces, 2012, vol. 4, páginas 44-48.	23-29,41,44
X	E. LUAIS et al., "Preparation and modification of carbon nanotubes electrodes by cold plasmas processes toward the preparation of amperometric biosensors", Electrochimica Acta, 2010, vol. 55, páginas 7916-7922.	23-29,41,44
Y	G. FABREGAT et al., "A rational design for the selective detection of dopamine using conducting polymers", Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, vol. 16, páginas 7850-7861.	1-22,30-40,42,43
Y	H. MORTENSEN et al., "Modification of glassy carbon surfaces by atmospheric pressure cold plasma torch", Japanese Journal of Applied Physics, 2006, vol. 45, nº 10B, páginas 8506-8511.	1-22,30-40,42,43
A	Q. LIU et al., "Electromechanical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using PVP/graphene modified electrodes", Talanta, 2012, vol. 97, páginas 557-562.	1-44
A	Y. WU et al., "A dopamine sensor based on a methoxypolyethylene glycol polymer covalently modified glassy carbon electrode", Analyst, 2013, vol. 138, páginas 1204-1211.	1-44

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
12.02.2016

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N27/26 (2006.01)**G01N27/30** (2006.01)**G01N33/50** (2006.01)**B82Y30/00** (2011.01)

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

G01N, B82Y

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, BD-TXT, XPESP, NLP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22,30-40,42,43	SI
	Reivindicaciones 23-29,41,44	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-44	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	J. ZHAO et al., Applied Materials & Interfaces, 2012, vol. 4, páginas 44-48.	2012
D02	E. LUAIS et al., Electrochimica Acta, 2010, vol. 55, páginas 7916-7922	2010
D03	G. FABREGAT et al., Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, vol. 16, páginas 7850-7861	2014
D04	H. MORTENSEN et al., Japanese Journal of Applied Physics, 2006, vol. 45, nº10B, páginas 8506-8511	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 se refiere a un procedimiento de recubrimiento de un sensor electroquímico para la detección de diversas sustancias orgánicas. Dicho procedimiento comprende las etapas de (1) recubrir un sustrato rico en carbono (con un contenido en carbono superior al 50% en peso respecto al sustrato) con un polímero orgánico y (2) aplicar al recubrimiento un tratamiento superficial con plasma frío. La invención también se refiere al sensor electroquímico obtenido por dicho procedimiento, así como al uso de dicho procedimiento para la fabricación de un sensor electroquímico para la detección de dopamina, glucosa, ácido úrico y ácido ascórbico.

Novedad:

El documento D01 divulga un bioelectrodo formado por nanotubos de carbono modificados que se utiliza para la fabricación de un sensor para la detección de dopamina en presencia de ácido ascórbico con elevada selectividad y sensibilidad. El electrodo de nanotubos de carbono en forma de red tridimensional (CNT-N) se modifica mediante un tratamiento con plasma frío a temperatura ambiente en atmósfera de O₂ a vacío (presión 0,6Torr durante 15min), lo que conduce a la formación de grupos funcionales oxigenados en la superficie del electrodo de carbono que incrementan su actividad y selectividad frente a biomoléculas (ver página 45, Apartados 2.2. y 3.2.).

El documento D02 divulga la preparación de electrodos de nanotubos de carbono modificados por tratamiento con plasma frío en atmósfera de CO₂ y N₂/H₂ a vacío (presión 0,3mbar durante 60s) con objeto de funcionalizar la superficie de los nanotubos de carbono con grupos aminados y oxigenados (ver página 7917, Apartado 2.2). Los electrodos así modificados se emplean en la elaboración de biosensores amperométricos con elevada sensibilidad para la detección de H₂O₂ en presencia de enzimas (HRP) (ver página 7921, Apartado 3.4.).

En consecuencia, a la vista de lo divulgado en los documentos D01 y D02 se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 23-29,41,44 no es nuevo y no implica actividad inventiva por lo que no satisface los criterios establecidos en los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.

Actividad inventiva:

El documento D03, considerado el estado de la técnica más próximo a la invención, divulga un sensor electroquímico para la detección selectiva de niveles reducidos de dopamina en mezclas ternarias con ácido ascórbico y ácido úrico. Dicho sensor consta de un electrodo de GCE ("*glassy carbon electrode*") sobre el cual se deposita una capa de polímero conductor que puede ser poli(3,4-etilendioxotiofeno) (PEDOT), poli(N-metilpirrol) (PNMPy) y poli(N-cianoetilpirrol) (PCMPy), y en el caso de los dos últimos se añade un recubrimiento superficial de nanopartículas de oro (AuNPs). La sensibilidad y resolución para la detección selectiva de dopamina en presencia de ácido ascórbico y ácido úrico de los sensores constituidos por electrodos PEDOT/GCE es significativamente superior a la obtenida con electrodos PNMPy/GCE o PNCPy/GCE.

La diferencia entre lo divulgado en D03 y el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-5,9,17-22,30-33,35-37, 39,40 radica en la aplicación de un tratamiento de superficie de plasma frío.

El documento D04 divulga un procedimiento de modificación de superficies de carbón vítreo ("*glassy carbon surfaces*") mediante tratamiento con plasma frío a presión atmosférica con objeto de mejorar la adhesión entre la superficie de carbón y la resina epoxi que lo recubre. Para dicho tratamiento se utiliza un plasma en atmósfera de He puro y/o mezclas He/NH₃ diluido (0,17%), con lo que se consigue la introducción de grupos funcionales polares que contienen oxígeno y nitrógeno en la superficie carbonada, lo que favorece de manera significativa la adhesión entre las superficies carbonosa y polimérica.

El problema técnico planteado en la solicitud es la preparación de un sensor electroquímico apto para la detección de diversas sustancias orgánicas como dopamina, glucosa, ácido úrico y/o ácido ascórbico de manera selectiva. Esto se consigue en la solicitud por un procedimiento de preparación de un sensor electroquímico mediante el recubrimiento de un sustrato carbonado con un polímero orgánico y aplicación de un tratamiento con plasma frío.

Este problema y su correspondiente solución ya han sido divulgados en D04, donde se describe el tratamiento con plasma frío de superficies de carbón vítreo que tienen un recubrimiento de resina epoxi con objeto de mejorar la adhesión entre ambas superficies. El tratamiento del plasma frío generado a presión atmosférica permite la formación de grupos funcionales polares en la superficie carbonada que favorecen de manera significativa la adhesión entre la superficie de carbón y la resina epoxi que la recubre (ver página 8506, Apartado 1 y página 8511, Apartado 4).

Un experto en la materia podría incorporar las características técnicas del procedimiento divulgado en D04 a la invención recogida en D03, dando como resultado el objeto técnico de las reivindicaciones 1-5,9,17-22,30-33,35-37,39,40 de la solicitud.

Respecto a las reivindicaciones dependientes 6-8,10-16 relativas a la naturaleza del recubrimiento polimérico sobre el sustrato de carbono, a la vista de lo divulgado en el documento D03 se considera que el experto en la materia se plantearía con razonables expectativas de éxito la inclusión de otros recubrimientos poliméricos convencionales, electroquímicamente activos o no activos, con objeto de mejorar la capacidad de detección del sensor. Por último, y respecto a las reivindicaciones dependientes 34,38,42,43 relativas al uso del sensor para detección de glucosa, el hecho de que se utilice específicamente para la detección de dicha sustancia no se considera que tenga un efecto sorprendente o inesperado, puesto que son ampliamente conocidos en el estado de la técnica sensores electroquímicos muy similares para la detección simultánea de diversas sustancias orgánicas como dopamina, ácido úrico y/ ácido ascórbico en diversos fluidos corporales, y por lo tanto carecen de actividad inventiva.

En consecuencia, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-22,30-40,42,43 carece de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en D03 y D04, por lo que dichas reivindicaciones no satisface los criterios establecidos en el artículo 8.1 LP 11/1986.