

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 454**

21 Número de solicitud: 201600860

51 Int. Cl.:

G01N 27/30 (2006.01)

H01M 4/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.10.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.02.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ ABEDUL, María Teresa;
NANNI, Paula Inés ;
NUÑEZ BAJO, Estefanía;
BLANCO COVIÁN, Lucía ;
GONZÁLEZ LÓPEZ, Andrea y
BLANCO LÓPEZ, María Del Carmen**

54 Título: **Dispositivo electroquímico para análisis de muestra con electrodos insertables**

57 Resumen:

Dispositivo electroquímico para análisis de muestra con electrodos insertables que comprende un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE), un electrodo auxiliar (AE) y unos medios de conexión a un sistema de alimentación y registro de datos. El electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) o el electrodo auxiliar (AE) son grapas (1) insertables que se disponen sobre una superficie de análisis (4) de muestra. El electrodo de trabajo (WE) además es una grapa (1) insertable modificada con una suspensión de tinta conductora de carbono dispuesta sobre su superficie.

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

FIG. 2A

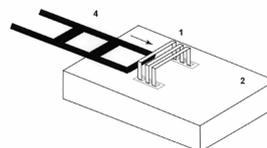
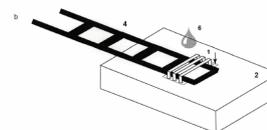


FIG. 2B



DESCRIPCIÓN

Dispositivo electroquímico para análisis de muestra con electrodos insertables.

5 El objeto de la presente invención consiste en un sistema electroquímico robusto, sencillo, económico y de gran precisión compuesto de tres grapas de acero inoxidable (electrodo de referencia, electrodo de trabajo y electrodo auxiliar), en el cual la grapa utilizada como electrodo de trabajo está recubierta con una tinta conductora de carbono. Las grapas son elementos conductores de tamaño y coste reducido que pueden ser
10 utilizados como electrodos para la detección electroquímica en dispositivos en papel u otros sustratos planos, como las membranas de nitrocelulosa, materiales textiles, plásticos, etc.

15 Para la obtención de la medida electroquímica, las grapas deben encontrarse en contacto con dichos sustratos planos, de forma que pueda suceder la transferencia de electrones entre una especie electroactiva que está en disolución y la superficie de la grapa. Esta transferencia es proporcional a la concentración de sustancia en disolución y permite la cuantificación de varias especies de interés.

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

Estado de la técnica

25 El desarrollo de herramientas eficaces para la detección sensible de biomoléculas y compuestos químicos ha ganado especial importancia en las últimas décadas con el fin de ser aplicadas para el análisis de muestras, principalmente, en los sectores clínico, medioambiental y alimentario. Las mejoras tecnológicas de estos dispositivos son proporcionadas por la miniaturización y simplificación, dos tendencias básicas en
30 Química Analítica (M. Valcárcel, M. S. Cárdenas. *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*. Springer, 2000).

35 Hoy en día esto es muy importante de cara a la descentralización de los análisis, que cada vez se realizan más fuera del laboratorio, especialmente en el campo clínico donde los dispositivos "*point-of-care*" (PoC, punto de cuidado) han aparecido recientemente y están sufriendo un gran avance (E. Schleicher. *Diagnostic assays*. *Anal Bioanal Chem* 2009, 393, 1391).

40 En el desarrollo de estos dispositivos impera la portabilidad y la necesidad de adaptación a un perfil de un usuario no especializado en el análisis (A. Warsinke. *Point-of-care testing of proteins*. *Anal Bioanal Chem*. 2009, 393, 1393). En este sentido, los ensayos analíticos en papel adquieren un rol importante, ya que se trata de un sustrato de bajo coste, sumado a otras ventajas como la de permitir la fácil funcionalización con
45 biomoléculas.

La detección electroquímica encaja perfectamente con la idea de un análisis descentralizado, dado que las técnicas requieren una instrumentación sencilla y de bajo coste (A. Nemiroski, D.C. Christodouleas, J. W. Hennek, A. A. Kumar, E.J. Maxwell, M.T. Fernández-Abedul, G.M. Whitesides. *A universal mobile electrochemical detector designed for use in resource-limited applications*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111,

11984). La combinación de electrodos en un sustrato de papel u otros sustratos planos hace posible la fabricación de dispositivos PoC. (A.C. Glavan, D.C. Christodouleas, B. Mosadegh, H.D. Yu, B.S. Smith, J. Lessing, M.T. Fernández-Abedul, G.M. Whitesides. *Folding analytical devices for electrochemical ELISA in hydrophobic R^H paper*. Anal. Chem., 2014, 86, 11999).

Para la fabricación de estos dispositivos electroanalíticos, existen elementos de distintos materiales que pueden ser utilizados como electrodos. Los alfileres de acero inoxidable fabricados en masa y de uso común son elementos conductores de tamaño y coste reducido, que pueden ser fácilmente empleados como electrodos para la detección electroquímica en dispositivos basados en papel u otros sustratos planos y también en otro material microfluídico, como hilo, siendo esto demostrado en dos artículos científicos, para la determinación de lactato (A. C. Glavan, A. Ainla, M. M. Hamedí, M. T. Fernández-Abedul, G. M. Whitesides. *Electroanalytical devices with pins and thread*. Lab Chip, 2016, 16, 112) y glucosa (E. C. Rama, A. Costa-García, M. T. Fernández-Abedul. *Pin-based electrochemical sensor with multiplexing possibilities*. Biosens. Bioelectron., 2016, in press). Asimismo, también han sido incorporados en un sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación de glucosa (E.C. Rama, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul. *Pin-based flow injection electroanalysis*. Anal. Chem., accepted).

Sin embargo, la cabeza de alfiler presenta un área electrónica demasiado pequeña lo cual incide negativamente en la respuesta de los test y resulta poco apropiada para la interrogación de líneas de ensayo (como es el caso de los conocidos test de flujo lateral). Hay que considerar además que los alfileres son punzantes y por lo tanto son un material que tiene que recibir una consideración especial de seguridad en un laboratorio, en cuanto a manejo y desechabilidad.

Por último, a diferencia de los métodos ópticos como la fluorescencia (LIF), los sistemas electroquímicos son fácilmente miniaturizables y no requieren complicados componentes ópticos, haciendo el sistema mucho más portable.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de detección electroquímica, preferentemente amperométrica, que puede ser aplicado a una gran variedad de sustratos laminares tales como papel, transparencias de acetato o textiles, con el fin de detectar, identificar y cuantificar especies, tanto iones metálicos como productos de reacciones enzimáticas, de interés clínico, alimentario y medioambiental, viéndose drásticamente reducido el coste al utilizar materiales de bajo coste comercialmente asequibles.

Es por tanto un aspecto de la invención un dispositivo electroquímico para análisis de muestra con electrodos insertables que comprende un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE), un electrodo auxiliar (AE) y unos medios de conexión a un sistema de alimentación y registro de datos. El electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) o el electrodo auxiliar (AE) se caracterizan por ser grapas insertables que se disponen sobre una superficie de análisis de muestra. Además, el electrodo de trabajo (WE) es una grapa insertable modificada con una suspensión de tinta conductora de carbono dispuesta sobre su superficie.

El transductor comprende tres grapas en forma de "U" de acero inoxidable cuyas coronas actúan como interfase con la disolución por la parte interna, uno de trabajo (WE), uno de referencia (RE) y otro auxiliar (AE), de una celda electroquímica.

5 Una vez conectadas por las puntas mediante conectores de gancho a un equipo potencióstático, se aplica un potencial entre los electrodos de trabajo y referencia y las reacciones electroquímicas tienen lugar en la interfase electrodo-disolución (parte cóncava de la grapa).

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

En otra realización preferida, la parte interna de la corona de la grapa de trabajo (o electrodo de trabajo) es lavada previamente con acetona e impregnada tres veces con una suspensión de carbono en dimetil formamida (DMF), preferiblemente del 50% con un curado a una temperatura de 80°C durante toda la noche.

15 El material del electrodo de trabajo, así como su área, son importantes para el correcto funcionamiento del sistema de detección electroquímico puesto que guardan relación directa con la sensibilidad. Así, como las grapas comerciales están recubiertas de un material aislante, aquellas sin lavar presentan menor sensibilidad y reproducibilidad que
20 las que han sido lavadas con acetona. Con el fin de obtener un material electrodo adecuado, las grapas son modificadas con carbono, de forma que la transferencia electrónica es más adecuada. Sin embargo, si la concentración de carbono en DMF es superior o inferior al 60% y el número de impregnaciones es inferior a 3, estos efectos no
25 son tan evidentes.

En una realización más específica las grapas tienen un espesor de 500 µm, un ancho de 1 mm y longitudes de corona y patas de 10 y 5 mm, respectivamente.

30 En una realización más preferible, se emplea una interfase de conexión fabricada con conectores de tipo hembra de interior metálico recubiertos con un plástico cuyos extremos superiores se acoplan a las patas de las grapas y los extremos inferiores son cables que facilitan la conexión al potencióstato. Estos conectores, a su vez, son reutilizables y mantienen una distancia fija entre las grapas o electrodos de 1 mm
35 facilitando el intercambio de las grapas.

En una configuración preferible, el electrodo de trabajo de carbono se sitúa entre los electrodos de referencia y auxiliar (grapadas de acero inoxidable) minimizando la distancia electrodo de trabajo-electrodo de referencia (lo que disminuye la caída óhmica) y no
40 estando el electrodo de referencia interferido por la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar.

En una realización más específica, un bloque de PDMS es fabricado mediante mezcla de
45 silicona y agente entrecruzante (como en los microchips de electroforesis convencionales) y posteriormente curado a temperatura ambiente alrededor del conector donde se incluyen las tres grapas, consiguiendo, una vez conectadas éstas, una base estable relativamente blanda para acoplar y cambiar los sustratos donde se realizarán los ensayos analíticos (medidas, determinaciones...).

50 Otro aspecto de la presente invención es la aplicación del sistema de detección que emplea la celda electroquímica compuesta por las tres grapas para la cuantificación de

analitos que o bien sean electroactivos o bien se determinen empleando bioensayos con dos tipos de marcas: i) enzimas (p.ej. peroxidasa de rábano silvestre), ii) nanopartículas metálicas (p.ej. plata). Esto se ha demostrado con dos inmunoensayos que emplean las marcas conjugadas a anticuerpos específicos: en el primer caso para la diagnosis de la celiacía (detección en estático) y en el segundo caso para la diagnosis de neumonía (detección en flujo, empleando tiras de flujo lateral).

En todos los casos, es útil el empleo del adaptador de conexión. En los dos primeros casos (detección de una especie electroactiva), que puede ser producto de una reacción enzimática dado que hay difusión de un producto enzimático hacia la superficie electródica, no es necesaria una presión elevada entre sustrato y grapa, pero en el caso de las nanopartículas metálicas, conjugadas a un anticuerpo que está inmovilizado en el papel, hace falta una mayor presión entre grapas y papel. De todas formas, el procedimiento de medida es común, independientemente de la molécula o ión a determinar, y sería válida para cualquier ensayo que empleara enzimas o moléculas electroactivas como especie indicadora:

- a) Realizar la reacción biológica de reconocimiento, en ambos casos inmunológica de tipo sándwich, cuyo analito es un antígeno o un anticuerpo de interés.
- b) Esperar a que la reacción se complete y/o se seque el sustrato laminar.
- c) Acoplar el sustrato al detector electroquímico basado en grapas, conectado al potencióstato.
- d) Adición del volumen adecuado de disolución de medida por la parte superior de las grapas de tal forma que todos los electrodos estén húmedos para el correcto funcionamiento de la celda electroquímica.
- e) Registro del voltamperograma cíclico o de onda cuadrada para obtener la señal analítica cuantificable específica de la especie electroactiva, marca o producto de la reacción enzimática.

Dada la existencia de potencióstatos portátiles comerciales, la facilidad de adquisición y bajo coste de las grapas de acero inoxidable, la fácil modificación del electrodo de trabajo (que puede hacerse en masa sin pérdida de señal debido a su estabilidad con el tiempo) y el acoplamiento a sustratos laminares, que a su vez son también de bajo coste y desechables, se pueden llevar a cabo determinaciones rápidas con dispositivos totalmente desechables con una reducción significativa del coste y con fácil uso por personas no especializadas en cualquier región, es decir, aplicables a análisis *in situ* o de campo (*field analysis*) o test en cabecera de paciente (PoCT).

Por otra parte, en el caso de las grapas, el área electródica es mayor que la que aporta la cabeza de un alfiler, por lo que se obtiene una mayor respuesta, y resulta muy apropiada para la interrogación de líneas de ensayo (como es el caso de los conocidos test de flujo lateral) ya que la grapa que actúa como electrodo de trabajo puede situarse directamente sobre la línea.

La invención se centra en el papel y sus derivados, tales como la nitrocelulosa, como superficie electródica para posteriores experimentos. El papel más utilizado para la construcción de estos dispositivos es el papel cromatográfico, que está disponible en una

gran variedad de grosores y tamaños de poro, pudiendo estar construido únicamente por celulosa, o en otros casos por nitrocelulosa. La gran ventaja que presentan estos tipos de papeles es que sobre ellos se pueden imprimir barreras hidrofóbicas, de manera que las disoluciones de trabajo se encuentren solo en el área delimitada para ello y no se extienden por el resto del papel. De esta manera, el papel actúa como una plataforma microfluidica formada por fibras de celulosa o nitrocelulosa que funcionan como canales. (J.Yu, L.Ge, J.Huang, S.Wang, S.Ge. Microfluidic paper-based chemiluminiscence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. Lab Chip. 2011, 11, 1286).

La impresión en cera es muy útil para fabricar dispositivos de papel de manera rápida y en grandes cantidades (E. Carrilho, A.W. Martínez, G.M Whitesides. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. Anal. Chem. 2019, 81, 7091). Para crear las barreras hidrofóbicas se emplea una impresora en la que la tinta es sustituida por cera sólida que funde en el mismo momento de la impresión.

El diseño de la celda electroquímica es uno de los pasos claves a la hora del desarrollo de una plataforma electroquímica, siendo la configuración seleccionada para la integración y aislamiento del sistema de detección electroquímico un sistema potencioestático de tres electrodos realizado con grapas de acero inoxidable preferiblemente previamente lavadas para eliminar el recubrimiento polimérico con el que en ocasiones vienen fabricadas.

Para acoplar los dispositivos de papel a la detección electroquímica, se debe modificar la grapa que actuará como electrodo de trabajo con tintas o pastas de carbono conductoras que permitan la transferencia de electrones con la sustancia electroactiva. Conectándolas a un potencioestado, se aplica un potencial entre el electrodo de trabajo y electrodo de referencia y se registra la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el auxiliar.

Las tintas de carbono son los materiales más usados para el desarrollo de electrodos en dispositivos de papel y ha sido el empleado en la primera integración de una detección electroquímica en papel (W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, Electrochemical detection for paper-based microfluidics, Anal. Chem. 2009, 81, 5821) pero también se utilizan otros materiales como tintas de oro o plata (W.R. de Araujo, T.R.L.C. Paixao, Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper, Analyst 2014, 139, 2742; A. Määttänen, U. Vanamo, P. Ihalainen, P. Pulkkinen, H. Tenhu, J. Bobacka, J. Peltonen, A low-cost paper-based inkjet-printed platform for electrochemical analyses, Sens. Actuat. 8, 2013, 177, 153).

La fragilidad, flexibilidad y ligereza del papel no favorecen una conexión directa y, por ello, también se ha diseñado una interfase de conexión de polidimetilsiloxano (PDMS), material polimérico utilizado para la construcción de dispositivos con detección electroquímica integrada (A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, Electrophoresis 2005, 26, 4664; J. Wang, G. Chen, M. Pumera, Electroanalysis 2003, 15, 862; R.-H. Horng, P. Han, H.-Y. Chen, K.-W. K.-W. Lin, T.-M. T.-M. Tsai, J. Micromech. Microeng. 2005, 15, 6; M. J. Schöning, M. Jacobs, A. Muck, D.-T. Knobbe, J. Wang, M. Chatrathi, S. Spillmann, Sens. Actuat. B, 2005, 108, 688; M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, Electrophoresis 2005, 26, 3160). Sobre dicha interfase se acoplan las grapas a través de un conector hembra de plástico exterior con interior metálico, y el sustrato de papel o cualquier otro sustrato plano puede deslizarse bajo las grapas del sistema de detección de manera uniforme y reproducible. La conexión

entre el dispositivo y el instrumento de medida es a su vez de gran eficacia y baja resistencia eléctrica.

5 Dada la novedad de esta plataforma electrónica, la detección electroquímica no ha sido estudiada previamente, ni por lo tanto empleada, en combinación con dispositivos en papel hasta el momento.

10 Estos dispositivos (totalmente miniaturizados, portátiles, desechables y de bajo coste) son de utilidad para el análisis, detección, identificación y cuantificación de analitos de interés en el sector clínico, medioambiental y agroalimentario, entre otros. Éstos pueden ser especies electroactivas (partículas y complejos metálicos, moléculas orgánicas...) o proteínas, ADN y otros analitos de interés, que si bien no son electroactivos pueden determinarse con bioensayos.

15 **Descripción de las figuras**

La Fig 1. muestra el esquema de una grapa de punta plana (1). Asimismo, se muestra la forma de acoplar la grapa a la interfase de conexión (2) que consta de un conector hembra de exterior plástico con interior metálico (línea de puntos) de la que salen unos cables por la parte inferior (3) que son conectados al potencióstato. Para mantener una distancia reproducible y facilitar la colocación de las tres grapas, se sustrajo la parte metálica de otro conector femenino que se situó en paralelo y ambos conectores se rodearon de PDMS (no se muestra por simplificar el esquema) manteniendo una distancia entre conectores de 10 mm (ancho de grapa). El conjunto de conectores rodeados por PDMS definen la interfase de conexión (2).

La Fig 2A. muestra el procedimiento a seguir para la detección electroquímica con grapas en un modo estático en papel cromatográfico. Después de colocar las grapas o electrodos (donde la grapa central ha sido impregnada con una suspensión conductora de carbono (1 x)) sin presionar en la interfase de conexión (2), se desliza una tira de papel cromatográfico (4) con barreras hidrofóbicas de cera que delimitan los sitios o áreas de ensayo (4 mm x 7 mm). La Fig 2B muestra el procedimiento a seguir para la detección de la disolución (6) una vez han sido colocadas las grapas (1) en la interfase de conexión (2). La disolución a medir (6) se pipetea por la parte superior después de situar una de las áreas hidrofílicas del papel cromatográfico (4) justo debajo de las grapas (1), hay que presionarlas ligeramente hacia el PDMS de la interfase de conexión (2). Una vez obtenida la señal electroquímica se cambian las grapas (1) y se desplaza la tira de papel cromatográfico repitiendo el mismo procedimiento.

40 La Fig 3. muestra los voltamperogramas cíclicos registrados variando el potencial desde -0.42 hasta 0.8 V con una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en una disolución de ferroceno 1 mM en disolución reguladora de fosfato 0.1 M de pH 7 obtenidos empleando diferentes grapas (1) y diferente área hidrofílica delimitada en sustrato de papel para cada medida o voltamperograma.

45 La Fig. 4 muestra los voltamperogramas cíclicos del sustrato enzimático conteniendo 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), empleado en el kit comercial CELIKEY variando el potencial desde -0.2 hasta 0.5 V con una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. En la Fig. 4A las medidas se realizaron sobre las mismas grapas (1) y diferente área hidrofílica delimitada en el sustrato de papel cromatográfico (4). En la Fig. 4B se muestran los voltamperogramas cíclicos para dos concentraciones diferentes del sustrato TMB del kit;

la línea sólida muestra el registro en la disolución inicial del sustrato y la línea discontinua el registro en una dilución 1:5 de la misma.

- 5 La Fig.5A muestra el esquema del resultado obtenido en un inmunoensayo de flujo lateral con detección visual. Las grapas (1) empleadas como electrodos se acoplan según se observa en la Fig. 5B, situando la grapa que actúa como electrodo de trabajo (1 x) sobre la línea test (7) del inmunoensayo. Dado que la marca no es enzimática, se sitúa en contacto directo y presionada sobre la línea. En la Fig. 5C se muestra la adición del electro lito de soporte (11) sobre la parte superior de las grapas (1), de manera que tanto
10 las tres grapas (1) como la membrana de nitrocelulosa (6) se mojan con una única gota. Una vez obtenida la señal electroquímica, tanto las grapas (1) como la tira de papel, constituida por la almohadilla de muestra (9), la membrana de nitrocelulosa (6) y la almohadilla absorbente (10), se desechan.
- 15 La Fig.6A muestra los voltamogramas cíclicos registrados con el sistema de detección basado en grapas (1) correspondientes al par $\text{Ag}(0)/\text{Ag}(I)$, variando el potencial entre -0.5 y 0.3 V con una velocidad de barrido de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Los voltamogramas cíclicos corresponden a dos concentraciones diferentes del analito (en este caso la proteína neumolisina). En la Fig. 6B se muestra la curva de calibrado realizada con varias
20 concentraciones de neumolisina, en concreto 1, 10, 25 y 50 ng/mL.

Explicación de una forma de realización preferente

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

Independientemente del ejemplo expuesto a continuación, en ambos casos se emplea la interfase de conexión (2) con las grapas (1) previamente colocadas según la disposición preferente en la que la grapa central es el electrodo de trabajo (Fig 1).
30

Ejemplo 1

- 35 Se ha empleado un sistema de detección, basado en una grapa de acero inoxidable tintada con carbono (1x) y dos grapas de acero inoxidable (1y) insertadas en la interfase de conexión (2), acoplado a tiras de papel cromatográfico (4) cuyas áreas analíticas fueron delimitadas con cera impresa para evitarla dispersión del líquido. De este modo, los líquidos se confinaron en una región apropiada para la detección por las grapas. Dicho sistema se evaluó con un compuesto cuyo comportamiento electroquímico es bien
40 conocido (ferroceno) para una posterior aplicación en la determinación de la enfermedad celiaca en estático.

- Una vez modificada una grapa de acero inoxidable con tinta de carbono (1X) para que actúe de electrodo de trabajo (WE), se colocaron las tres grapas que actuaron como
45 electrodos en la interfase de conexión (2), dejando un hueco entre la parte interna de la corona de las grapas y la base de PDMS de tal modo que se puede introducir fácilmente el sustrato plano (Fig. 2A), en este caso papel cromatográfico (4). Se conectó la interfase de conexión (2), al sistema potencioestático mediante conectores de gancho colocados en
50 los cables (3).

La creación de áreas hidrofóbicas en el sustrato de papel cromatográfico (4) se llevó a cabo mediante el diseño con un software, impresión en superficie con una impresora de cera y fusión a 110°C para difundir la cera creando barreras hidrofóbicas tridimensionales que en este caso fueron rectángulos de 4 mm x 7 mm. Para evitar la posterior dispersión de líquidos, posible pérdida de analitos y contaminación del soporte de PDMS, se adhirió una base plástica rígida y fina (denominada *backing*). Por cada tira de papel que se empleó se obtuvieron 9 celdas analíticas, por lo que se pudieron realizar 9 medidas en diferentes disoluciones o gotas.

Una vez creadas las barreras hidrofóbicas y colocadas las grapas (1) en la interfase de conexión (2), se colocó la tira de papel cromatográfico (4) de tal forma que la parte hidrofílica coincidía con la parte interior de la corona de las grapas. Estas se empujaron ligeramente hacia abajo hasta el límite que permite la interfase de conexión (2), de forma que el papel pudiera deslizarse de un área a otra y las grapas hacían contacto a través de una fina película de disolución que actuaba como electrolito de soporte o conductor iónico (Fig. 2B).

A continuación se adicionaron 9 μL de disolución 1 mM de ferroceno en disolución reguladora de fosfato pH 7 por la pa11e superior de las grapas y se aplicó un barrido cíclico de potenciales entre -0.2 y 0.8 V con una velocidad de barrido de 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Una vez obtenida la curva o voltamperograma cíclico, se cambiaron las grapas por otras nuevas y limpias y la tira de papel cromatográfico (4) se desplazó de tal modo que coincidiese un área hidrofílica nueva con las grapas (1). Los resultados (Fig. 3) muestran una gran reproducibilidad interelectrónica y comportamiento electroquímico del par ferroceno / ión ferricinio similar a los electrodos comerciales. Alternativamente, pueden emplearse las mismas grapas y deslizar el papel para presentar una nueva área analítica al sistema electródico de tres grapas.

Una vez confirmado el correcto y reproducible funcionamiento del sistema integrado (papel cromatográfico (4) en combinación con las grapas (1) conectadas al potencióstato a través de la interfase de conexión (2)) en un formato estático, se procedió a su aplicación para la determinación de anticuerpo anti-transglutaminasa, biomarcador de la enfermedad celiaca. Para ello, se llevaron a cabo de forma independiente los inmunoensayos empleando un kit ELISA comercial, VARELISA (Celikey), que incluía placas ELISA con antígeno (transglutaminasa) inmovilizado y siguiendo las indicaciones de la casa comercial, detectando con las grapas el producto de la reacción enzimática de la enzima HRP con una mezcla TMB/peróxido de hidrógeno presente en el sobrenadante de los pocillos para diferentes concentraciones de anti-transglutaminasa, control positivo y control negativo. En la Fig. 4A se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados en una disolución del sustrato enzimático para distintos sistemas papel/grapas y en la Fig. 4B se muestran los voltamperogramas correspondientes a disoluciones de sustrato enzimático de dos concentraciones diferentes, donde se aprecia la clara diferencia entre ambos.

Ejemplo 2

Además del formato estático, el sistema de detección basado en los tres electrodos o grapas de acero inoxidable citado en el ejemplo 1 se acopló también a un inmunoensayo de flujo lateral o ensayo inmunocromatográfico (5), consistente en una membrana de nitrocelulosa (6) en la que se inmovilizaron los biorreactivos de interés. Posteriormente, la

muestra y otros reactivos se movieron por capilaridad a unas zonas preparadas como "zona de prueba o test" (7) y "zona de control" (8). La aparición de una línea coloreada o dos se atribuyó a un test negativo o positivo, respectivamente (Figura 5.a). El sistema más conocido es el test del embarazo, que constituye un ejemplo claro de la cercanía a la comercialización de estos dispositivos y su rápida aceptación.

Se ha seleccionado como inmunoensayo modelo para el desarrollo del sistema el empleado para la determinación de neumolisina, proteína adecuada para la detección precoz de la neumonía.

La tira de nitrocelulosa se colocó sobre una tarjeta soporte con adhesivo (Fig. 5A). Se trazaron las líneas de test y control dispensando el anticuerpo monoclonal anti-neumolisina PLY-4 y anti-IgG de ratón respectivamente, a una velocidad de 0,100 $\mu\text{l}/\text{mm}$. Las tiras se secaron luego a 37°C durante 30 minutos. La preparación del sustrato del ensayo se completó colocando una almohadilla de muestra (9) y otra almohadilla absorbente (10) a ambos lados de la membrana, con una superposición de 2 mm aproximadamente. La tarjeta se cortó luego en tiras de 5 mm. Para realizar el ensayo, esta tira (5) se sumergía en disolución patrón o muestra, en presencia del anticuerpo de detección (PLY -7) conjugado a nanopartículas.

La cuantificación se realizó una vez ha finalizado el inmunoensayo. Para ello el electrodo de trabajo modificado con una suspensión conductora de carbono (IX) se posiciono sobre la línea test, donde tiene lugar el inmunoensayo tipo sándwich (en este caso), entre la proteína de interés o analito y los anticuerpos de captura (inmovilizado sobre la membrana de nitrocelulosa (6)) y detección (conjugado a una marca, habitualmente de tipo visual) (Fig. 5B).

Dicho sistema se evaluó con la detección de nanopartículas metálicas conjugadas, en concreto nanopartículas de plata.

Estas nanopartículas son atractivas debido a sus excelentes perspectivas como nuevo biomarcador para medidas tanto cualitativas (visuales) como cuantitativas, además de sus buenas propiedades como material conductor y su estabilidad química, lo que las hace idóneas para la detección electroquímica. Por otra parte, el comportamiento electroquímico es bien conocido, lo cual facilita su detección electroquímica.

Para la detección se puede utilizar el mismo sistema de base de PDMS citado en el ejemplo 1 (Fig. 2A) con la diferencia de que en este segundo ejemplo las grapas (1) deben estar en contacto directo y presionadas contra la nitrocelulosa, para la detección de las nanopartículas metálicas. La conexión con el potencióstato se realiza entonces siguiendo el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 mediante conectores (3) de gancho colocados en los cables.

En el presente caso, como prueba de concepto y para asegurar que existe un buen contacto y presión entre el inmunoensayo de flujo lateral y las grapas, se ha utilizado una grapadora general, con las dimensiones adecuadas para poder grapar directamente nuestras grapas. La conexión al potencióstato se consigue de igual manera que en el caso de la interfase de conexión (2) de PDMS, con conectores de gancho (3), conectado a la misma grapa (1) (Fig. 5C).

5 Con este último sistema, para realizar la detección electroquímica se adiciono una disolución ácida (11), concretamente 40 μL de ácido nítrico 0.1 M, para obtener los iones de Ag(I) a partir de las nanopartículas de Ag(0) . Esta disolución se añadió sobre la parte superior de las grapas (1), aplicando a su vez un barrido cíclico de potenciales entre -0.5 y 0.3 V con una velocidad de barrido de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La medida, a diferencia del ejemplo 1, se realizó de forma instantánea, ya que en este caso la superficie de medida no se encontraba delimitada por barreras hidrofóbicas, por lo que la disolución migró por la base y alrededores de la membrana de nitrocelulosa produciendo una dilución de la muestra.

10

Una vez registrado el voltamperograma cíclico, se cambiaron tanto las grapas (1) como la tira de flujo lateral (5) por otra nueva, con la misma o diferente concentración de analito sobre la línea test (7). En la Fig. 5B se muestran varios voltamperogramas cíclicos, en los cuales, además de verse el comportamiento electroquímico del par Ag(0)/ Ag(I) , similar al obtenido con electrodos comerciales, la señal es proporcional a la concentración de analito presente sobre la línea test (7) del inmunoensayo de flujo lateral (5).

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo electroquímico para análisis de muestra con electrodos insertables que comprende un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE), un electrodo auxiliar (AE) y unos medios de conexión a un sistema de alimentación y registro de datos **caracterizado** por que:
- 10 el electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) o el electrodo auxiliar (AE) son grapas (1) insertables que se disponen sobre una superficie de análisis (4) de muestra, donde el electrodo de trabajo (WE) es una grapa (1) insertable modificada con una suspensión de tinta conductora de carbono dispuesta sobre su superficie.
- 15 2. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que los medios de conexión son una interfase de conexión (2) con huecos donde se insertan las grapas (1).
3. Dispositivo según la reivindicación 2 **caracterizado** por que la interfase de conexión (2) es una interfase polimérica de polidimetilsiloxano (PDMS).
- 20 4. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que la superficie de análisis (4) es un papel cromatográfico.
- 25 5. Dispositivo según la reivindicación 4 **caracterizado** por que el papel cromatográfico es deslizable respecto a las grapas (1) y comprende barreras omnifóbicas que delimitan áreas de ensayo.
6. Dispositivo según la reivindicación 5 **caracterizado** por que el papel cromatográfico comprende barreras hidrofóbicas de cera que delimitan áreas de ensayo.
- 30 7. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que la superficie de análisis (4) es una lámina textil.
- 35 8. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que la superficie de análisis (4) es una tira de flujo lateral que comprende una línea test (7), sobre la que se insertan las grapas (1) de forma que el electrodo de trabajo (WE) se sitúa sobre la línea test (7) de inmunoensayos de flujo lateral y por que los medios de conexión comprenden unos conductores eléctricos acoplables a las grapas (1).
- 40 9. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que todas las grapas (1) están modificadas con una suspensión de tinta conductora de carbono dispuesta sobre sus superficies.
- 45 10. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que el electrodo de trabajo (WE) es una grapa (1) insertable modificada con una suspensión de tinta conductora de carbono y metal o aleaciones metálicas dispuesta sobre su superficie.
11. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que el electrodo de referencia (RE) es una grapa (1) insertable modificada con una suspensión de metal o aleaciones metálicas dispuesta sobre su superficie.
- 50 12. Dispositivo según la reivindicación 10 u 11 **caracterizado** por que el metal o aleaciones metálicas es plata o plata/cloruro de plata.

13. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** por que la suspensión comprende nanomateriales metálicos o de carbono.

5 14. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que comprende varios electrodos de trabajo (WE) en un formato multielectrodo.

10 15. Dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** por que solo se emplean dos grapas (1), una que actúa como electrodo de trabajo (WE) y otra como electrodo de referencia (RE).

FIG. 1

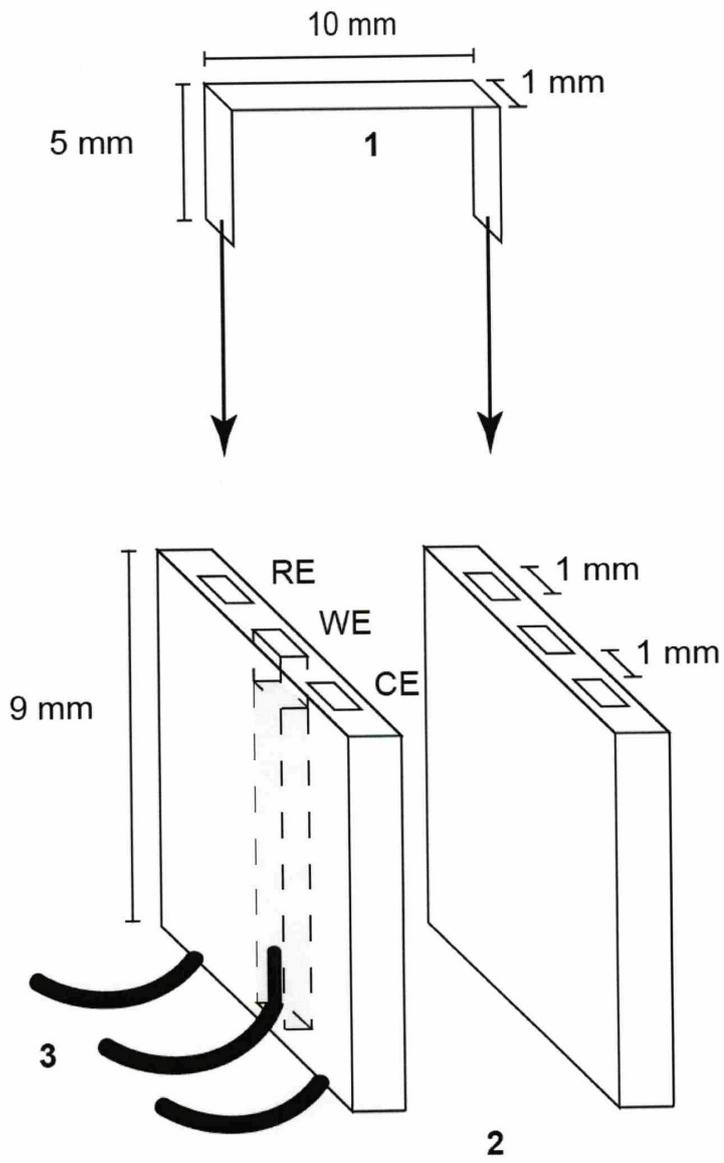


FIG. 2A

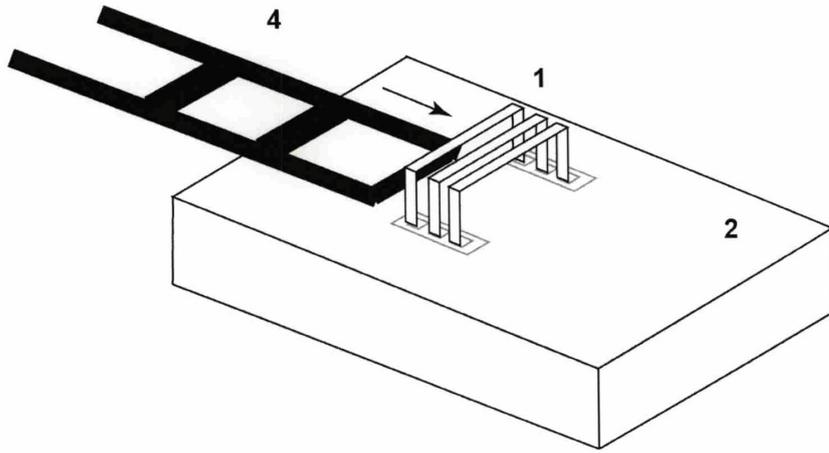


FIG. 2B

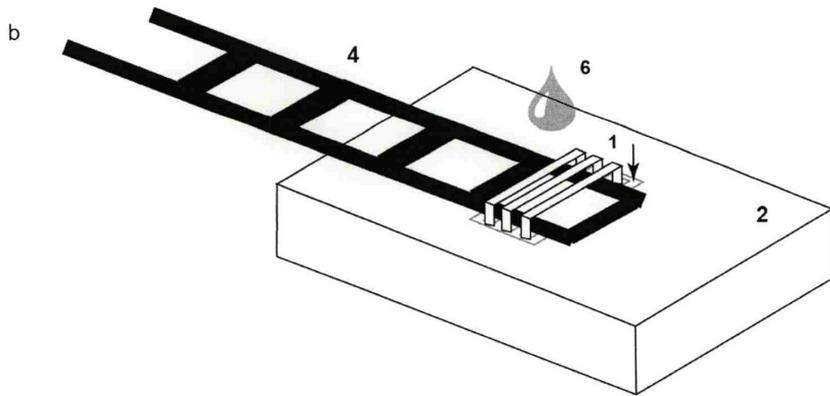


FIG. 3

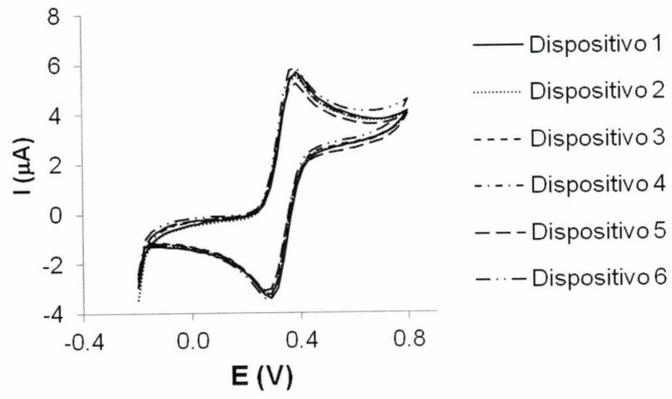


FIG. 4A

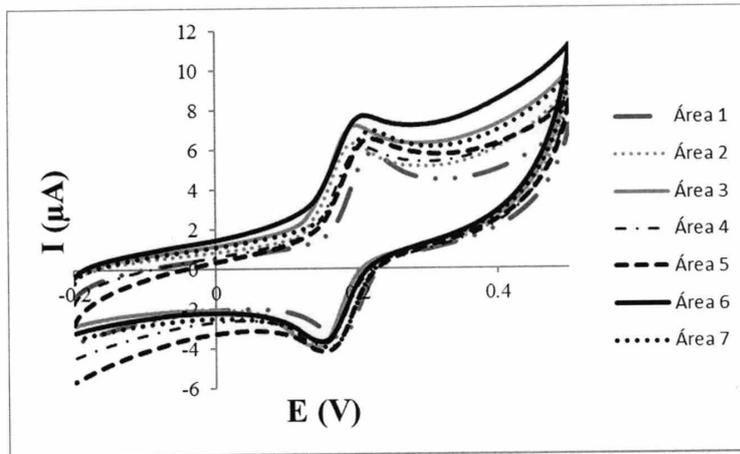


FIG. 4B

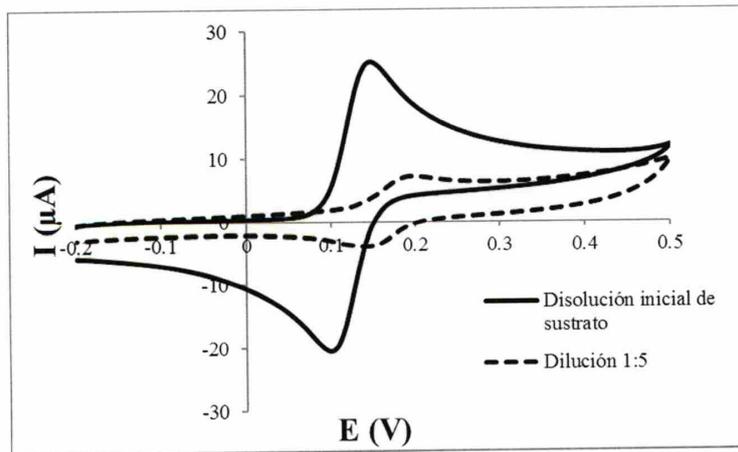


FIG. 5A

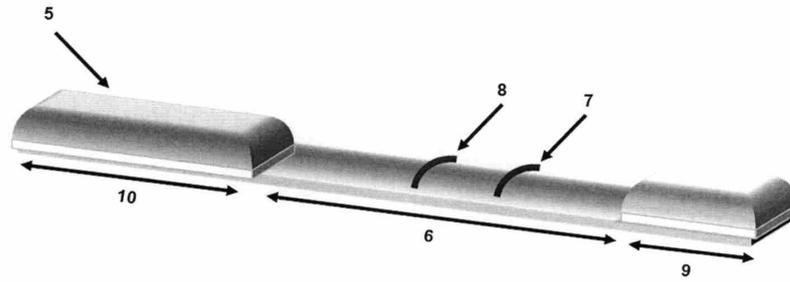


FIG. 5B

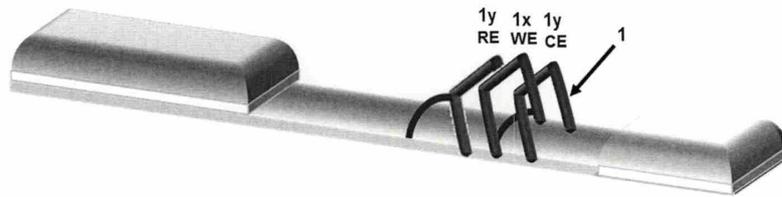


FIG. 5C

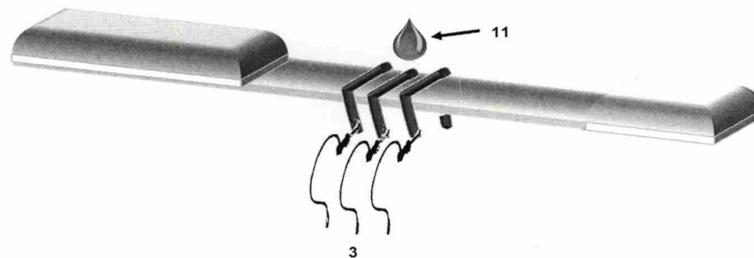


FIG. 6A

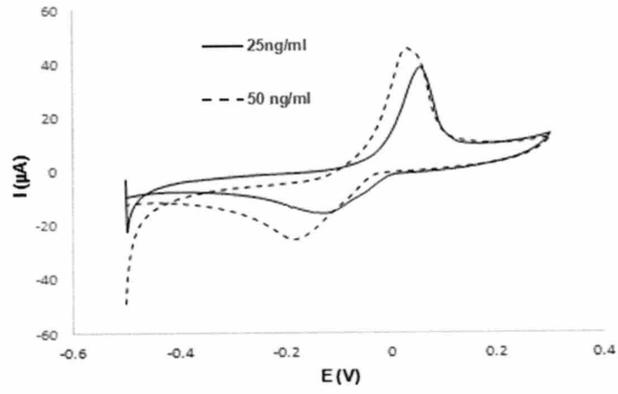
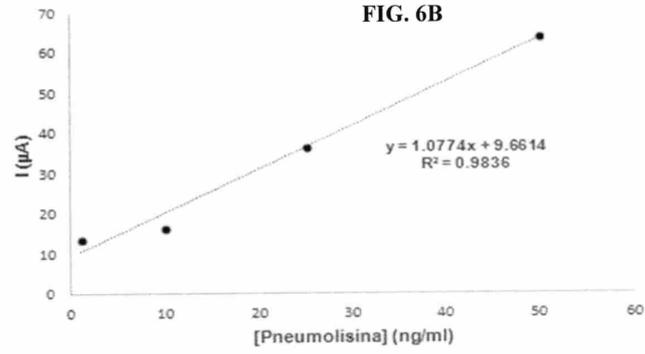


FIG. 6B





- ②① N.º solicitud: 201600860
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N27/30** (2006.01)
H01M4/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FOSDICK, Stephen E., et al. Wire, mesh, and fiber electrodes for paper-based electroanalytical devices. Analytical chemistry, 2014, vol. 86, no 7, p. 3659-3666; apartado Experimental Section.	1-15
A	SILVEIRA, Célia M.; MONTEIRO, Tiago; ALMEIDA, Maria Gabriela. Biosensing with Paper-Based Miniaturized Printed Electrodes—A Modern Trend. Biosensors, 28/09/2016, vol. 6, no 4, p. 51; páginas 3-7.	1-15
A	IHALAINEN, Petri, et al. Paper-supported nanostructured ultrathin gold film electrodes—Characterization and functionalization. Applied Surface Science, 2015, vol. 329, p. 321-329; apartado 2.	1-15
A	LI, Xiao; ZHAO, Chen; LIU, Xinyu. A paper-based microfluidic biosensor integrating zinc oxide nanowires for electrochemical glucose detection. Microsystems & Nanoengineering, 2015, vol. 1, páginas 2-3.	1-15

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
31.01.2017

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

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

H01M, G01N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FOSDICK, Stephen E., et al. Analytical chemistry, vol. 86, no 7, p. 3659-3666.	2014
D02	SILVEIRA, Célia M.; MONTEIRO, Tiago; ALMEIDA, Maria Gabriela. Biosensors, vol. 6, no 4, p. 51.	28/09/2016
D03	IHALAINEN, Petri, et al. Applied Surface Science, vol. 329, p. 321-329.	2015
D04	LI, Xiao; ZHAO, Chen; LIU, Xinyu. Microsystems & Nanoengineering, vol. 1, páginas 2-3.	2015

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 presente invención es un dispositivo electroquímico para análisis de muestra que comprende un electrodo de trabajo (WE), un electrodo de referencia (RE), un electrodo auxiliar (AE), unos medios de conexión a un sistema de alimentación y un medio de registro de datos caracterizado por que los electrodos son grapas insertables que se disponen sobre la superficie de análisis, estando además la superficie de trabajo del electrodo de trabajo (WE) modificada con una suspensión de tinta de carbono.

En el documento D01 se estudian distintos tipo de electrodos para dispositivos electroanalíticos basados en papel. En concreto, sobre la superficie de papel cromatográfico, plegado mediante la técnica origami, se depositan los electrodos de trabajo, auxiliar y referencia. En concreto, para el electrodo de trabajo se utilizan tanto oro en forma de microhilos o fibra de carbón con dimensiones micrométricas (apartado experimental)

El documento D02, relativo a la impresión de electrodos miniaturizados sobre papel para su uso como biosensores, describe dispositivos electroquímicos que comprende tres electrodos (trabajo, auxiliar y referencia) a partir de tintas conductoras de carbono o metálicas depositadas sobre una superficie de papel mediante serigrafía, impresión por chorro de tinta o la técnica de "dibujo a lápiz" (páginas 3-7)

El documento D03 se refiere a un dispositivo electroquímico para análisis que se obtiene a partir de la deposición de láminas de oro ultrafinas sobre un sustrato de papel recubierto con látex (apartado 2)

El documento D04 describe un dispositivo electroquímico para la detección de glucosa basado en papel que emplea como electrodo de trabajo nanopartículas de óxido de zinc, como electrodo auxiliar un electrodo de carbono y como electrodo de referencia Ag/AgCl). Así mismo, comprende una interfase polimérica de polidimetilsiloxano (PDMS) (páginas 2-3).

Ninguno de los documentos D01-D04 ni cualquier combinación relevante de los mismos, divulga un dispositivo electroquímico en el que los electrodos sean grapas insertables sobre una superficie de papel cromatográfico delimitado con barreras hidrofóbicas de cera, estando la superficie del electrodo de trabajo modificada con una tinta de carbono.

Además, dicho dispositivo no sería obvio para un experto en la materia a partir de los documentos citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-15 es nuevo e implica actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.)