

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 507**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2010 PCT/US2010/026499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10102279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2010 E 10712600 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2403645**

54 Título: **Dispositivos microfluídicos y electroquímicos**

30 Prioridad:

**06.03.2009 US 158251 P**

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

**17.05.2017**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (100.0%)  
17 Quincy Street  
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**NIE, ZHIHONG;  
NIJHUIS, CHRISTIAN;  
CHEN, XIN;  
MARTINEZ, ANDRES, W.;  
NAROVLYANSKY, MAX y  
WHITESIDES, GEORGE, M.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 612 507 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivos microfluídicos y electroquímicos

5 Solicitudes relacionadas

Antecedentes

10

La materia descrita se refiere generalmente a dispositivos microfluídicos.

15

En los últimos años, los sistemas microfluídicos han atraído intereses crecientes debido a sus aplicaciones potenciales diversas y generalizadas. Por ejemplo, mediante el uso de volúmenes muy pequeños de muestras, los sistemas microfluídicos podrían llevar a cabo complicadas reacciones bioquímicas para adquirir información química y biológica importante. Entre otras ventajas, los sistemas microfluídicos reducen la cantidad requerida de muestras y reactivos, acortan el tiempo de respuesta de las reacciones y disminuyen la cantidad de residuos de riesgo biológico para su eliminación.

20

Desarrollados por primera vez a principios de la década de los 1990, los dispositivos microfluídicos se fabricaron inicialmente en silicio y vidrio mediante el uso de técnicas de fotolitografía y grabado adaptadas de la industria de la microelectrónica. Los dispositivos microfluídicos actuales se construyen de plástico, silicona u otros materiales poliméricos, p. ej. polidimetilsiloxano (PDMS). Tales dispositivos son generalmente caros, inflexibles y difíciles de construir.

25

El análisis electroquímico implica métodos para medir el potencial y/o la corriente de una muestra fluidica que contiene analitos, que se usa ampliamente en el campo de la medicina o en estudios ambientales. El análisis electroquímico usualmente utiliza instrumentos sofisticados y se lleva a cabo por técnicos especialmente entrenados. Sin embargo, para su uso en los países en desarrollo, en el campo, o en los contextos de cuidados de salud en el hogar, existe una necesidad de dispositivos analíticos que sean baratos, portátiles y fáciles de construir y usar.

30

Resumen de la invención

Se describen dispositivos microfluídicos y electroquímicos.

35

En un aspecto, se describe un dispositivo microfluídico y electroquímico, que incluye:

40

un primer ensamble de electrodo que incluye una primera capa de sustrato que soporta uno o más electrodos; y una primera capa hidrófila porosa que se superpone al ensamble de electrodo, en donde la capa hidrófila incluye un límite impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la capa hidrófila y define uno o más canales hidrófilos dentro de la capa hidrófila, en donde uno o más canales hidrófilos incluyen una primera región hidrófila que está en comunicación fluidica con uno o más electrodos.

En algunas modalidades, el ensamble de electrodo incluye además un material de barrera que rodea al menos una porción del electrodo.

45

En cualquiera de las modalidades precedentes, el dispositivo microfluídico y electroquímico incluye además:

50

una capa impermeable a los fluidos que se superpone y entra en contacto con al menos una porción de la primera capa hidrófila; y una segunda capa hidrófila porosa que se superpone y entra en contacto con al menos una porción de la capa impermeable a los fluidos, en donde la segunda capa hidrófila incluye un límite impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la segunda capa hidrófila y define uno o más canales hidrófilos dentro de la segunda capa hidrófila, en donde la capa impermeable a los fluidos incluye una o más aberturas en alineación y en comunicación fluidica con al menos una porción de un canal hidrófilo dentro de cada capa hidrófila.

55

En cualquiera de las modalidades precedentes, un medio hidrófilo poroso se dispone en la abertura de la primera capa impermeable a los fluidos y está en comunicación fluidica con al menos una porción de un canal hidrófilo dentro de las capas hidrófilas.

60

En cualquiera de las modalidades precedentes, el ensamble de electrodo incluye un electrodo de trabajo y un contraelectrodo.

65

En cualquiera de las modalidades precedentes, el primer ensamble de electrodo incluye un electrodo de trabajo, y el dispositivo microfluídico y electroquímico incluye además un segundo ensamble de electrodo que incluye un contraelectrodo que incluye una segunda capa de sustrato que soporta el contraelectrodo, en donde el contraelectrodo se rodea sustancialmente por un material de barrera.

- 5 En cualquiera de las modalidades precedentes, la primera capa hidrófila porosa que incluye la primera región hidrófila se dispone entre los primer y segundo ensambles de electrodo y en donde la primera región hidrófila está en comunicación fluidica con el electrodo de trabajo y el contreelectrodo.
- 10 En cualquiera de las modalidades precedentes, el dispositivo microfluídico y electroquímico incluye además un colector de fluido, en donde el colector de fluido está en comunicación fluidica con un extremo del canal hidrófilo que incluye la primera región hidrófila.
- 15 En cualquiera de las modalidades precedentes, el colector de fluido incluye un papel de celulosa secante.
- En cualquiera de las modalidades precedentes, el medio hidrófilo poroso incluye papel.
- 20 En cualquiera de las modalidades precedentes, la primera o segunda capa hidrófila porosa incluye papel.
- En cualquiera de las modalidades anteriores, la primera o segunda capa de sustrato incluye un papel o una película de plástico.
- 25 En cualquiera de las modalidades precedentes, el material de barrera incluye material fotorresistente polimerizado dispuesto sobre la película de papel o de plástico y que rodea sustancialmente el electrodo.
- En cualquiera de las modalidades precedentes, el material de barrera incluye una lámina impermeable a los fluidos que tiene aberturas de una dimensión para recibir el electrodo, dicha lámina impermeable a los fluidos dispuesta sobre la primera o segunda capa de sustrato y que rodea sustancialmente el electrodo.
- 30 En cualquiera de las modalidades precedentes, la primera o segunda capa de sustrato son integrales y forman un cuerpo unitario con el material de barrera.
- En cualquiera de las modalidades precedentes, la lámina impermeable a los fluidos incluye una cinta adhesiva de doble cara.
- 35 En cualquiera de las modalidades precedentes, la capa impermeable a los fluidos incluye una cinta adhesiva.
- En cualquiera de las modalidades precedentes, el primer o segundo ensamble de electrodo incluye además un electrodo de referencia.
- En otro aspecto, se describe un método de preparación de un dispositivo microfluídico y electroquímico, que incluye:
- 40 disponer una capa de barrera hidrófoba que incluye una plantilla que incluye una o más aberturas a una capa de soporte;
- depositar material electroconductor en la(s) abertura(s) para formar uno o más electrodos; y
- unir una capa hidrófila porosa que incluye una barrera impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la capa hidrófila porosa con patrones y define un límite de uno o más canales hidrófilos en la capa hidrófila porosa;
- 45 en donde el canal hidrófilo incluye una primera región hidrófila; y la primera región hidrófila está en comunicación fluidica con el(los) electrodo(s).
- En cualquiera de las modalidades precedentes, el método incluye además:
- 50 unir una o más capas hidrófilas porosas que incluyen una barrera impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la capa hidrófila porosa con patrones y define un límite de uno o más canales hidrófilos en la capa hidrófila porosa con patrones; y
- 55 disponer una segunda capa impermeable a los fluidos entre las capas hidrófilas porosas con patrones adyacentes; en donde la segunda capa impermeable a los fluidos incluye una o más aberturas; y cada abertura está en alineación y en comunicación fluidica con una o más porciones de uno de los canales hidrófilos.
- En otro aspecto más, un método para determinar la presencia de uno o más analitos en una muestra fluidica mediante el uso de un dispositivo microfluídico y electroquímico de cualquiera de las modalidades precedentes, que incluye:
- 60 depositar una muestra fluidica en uno de uno o más canales hidrófilos de la capa hidrófila porosa para proporcionar el contacto fluidico de la muestra con el(los) electrodo(s); y
- medir una señal electroquímica mediante el uso del(de los) electrodo(s).
- 65 En cualquiera de las modalidades precedentes, la señal electroquímica se correlaciona con una concentración del(de los) analito(s).

En cualquiera de las modalidades precedentes, la señal electroquímica se correlaciona con la presencia del(de los) analito(s).

5 En cualquiera de las modalidades precedentes, la muestra fluidica se deposita en una región del canal hidrófilo situado sustancialmente sobre uno o más electrodos.

10 En cualquiera de las modalidades precedentes, el dispositivo microfluidico y electroquímico incluye además un colector de fluido en comunicación fluidica con un extremo distal del canal hidrófilo que incluye la primera región hidrófila; y el método que incluye además:

15 depositar la muestra fluidica en un extremo proximal del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila; en donde la muestra fluidica se transporta por acción capilar sobre el electrodo y dentro del colector de fluido; y en donde se mantiene un flujo fluidico constante de la muestra fluidica a través del(de los) electrodo(s).

20 En cualquiera de las modalidades precedentes, la medición de una señal electroquímica incluye medición de impedancia, medición de corriente o tensión.

25 En cualquiera de las modalidades precedentes, la medición electroquímica se selecciona del grupo que consiste en amperometría, biamperometría, voltamperometría de redisolución, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría cíclica, coulometría, cronoamperometría y potenciometría.

30 En cualquiera de las modalidades precedentes, la medición electroquímica es cronoamperometría y el analito incluye glucosa, colesterol, ácido úrico, lactato, gases en sangre, ADN, hemoglobina, óxido nítrico y cetonas en sangre.

35 En cualquiera de las modalidades precedentes, la medición de una señal electroquímica incluye voltamperometría de redisolución anódica.

40 En cualquiera de las modalidades precedentes, el analito incluye un ion de metal pesado o una mezcla de iones de metales pesados.

Como se usa en la presente descripción, "3-D" y "tridimensional" se usan indistintamente.

45 Como se usa en la presente descripción, "μPED" se refiere a un dispositivo microfluidico y electroquímico de papel. Como se usa en la presente descripción, "F-F μPED" se refiere a un dispositivo microfluidico y electroquímico de papel, frente a frente. Como se usa en la presente descripción, "S-S μPED" se refiere a un dispositivo microfluidico y electroquímico de papel, uno junto al otro.

50 Breve descripción de las figuras

Las modalidades no limitantes de la presente invención se describirán a manera de ejemplo con referencia a las figuras acompañantes, en las cuales:

55 La Figura 1 es una ilustración de un dispositivo microfluidico y electroquímico fabricado por apilamiento de una capa de sustrato con electrodos, una capa impermeable a los fluidos y una capa de capa hidrófila porosa con patrones que comprende una primera región hidrófila; la Figura 1(a) ilustra una vista en perspectiva del dispositivo; la Figura 1(b) ilustra una vista superior del dispositivo;

60 La Figura 2 es una ilustración de un dispositivo microfluidico tridimensional fabricado por apilamiento de una primera capa de sustrato con electrodo(s), una primera capa impermeable a los fluidos, una capa de capa hidrófila porosa con patrones que comprende una primera región hidrófila, una segunda capa impermeable a los fluidos, y una segunda capa de sustrato con electrodo(s); la Figura 2(a) ilustra una vista superior del dispositivo; la Figura 1(b) ilustra una vista lateral del dispositivo;

65 La Figura 3 es una ilustración de un dispositivo microfluidico y electroquímico fabricado por el apilamiento de una capa de sustrato con electrodos, una capa impermeable a los fluidos, una capa de capa hidrófila porosa con patrones que comprende una primera región hidrófila y un colector de fluido; la Figura 3(a) ilustra una vista esquemática del dispositivo; la Figura 3(b) ilustra una vista superior del dispositivo;

Las Figuras 4(a) y 4(c) son ilustraciones de un dispositivo microfluidico y electroquímico fabricado por apilamiento de una capa de sustrato con electrodos y múltiples capas de capas hidrófilas porosas con patrones con una capa impermeable a los fluidos dispuesta entre cada dos capas hidrófilas porosas con patrones adyacentes y entre la capa de sustrato adyacente y la capa hidrófila porosa con patrones; las Figuras 4(b) y 4(d) son ilustraciones de un dispositivo microfluidico fabricado por el apilamiento de múltiples capas de capas hidrófilas porosas con patrones con una capa impermeable a los fluidos dispuesta entre cada dos capas hidrófilas porosas con patrones adyacentes;

La Figura 5 (a) ilustra voltamogramas cíclicos de 2.0 mM de ácido carboxílico de ferroceno en una solución acuosa de 0.5 M de KCl (pH = 7.0) en un  $\mu$ PED a varias velocidades de exploración (ascendente a lo largo del eje y): 50, 100, 200, 300, 400, y 500 mV/s; (b) ilustra la gráfica de la corriente de pico anódico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de exploración ( $v^{1/2}$ ) para los experimentos CV realizados en un dispositivo de papel ( $\bullet$ ) y en una solución a granel ( $\circ$ ); las líneas continuas representan un ajuste lineal a ( $\bullet$ ) con la ecuación de regresión:  $y = -3.6 + 3.5x$  ( $R^2 = 0.998$ ,  $n=8$ ) y un ajuste lineal a ( $\circ$ ) con la ecuación de regresión:  $y = -7.1 + 5.6x$  ( $R^2 = 0.999$ ,  $n=8$ );

La Figura 6(a) ilustra curvas cronoamperométricas representativas para las concentraciones de glucosa (mM): (mM): 0 (1), 0.2 (2), 2.8 (3), 5.6 (4), 13.9 (5) y 22.2 (6) en los  $\mu$ PEDs; (b) ilustra gráficas de calibración de la corriente en función de la concentración de glucosa para la detección de glucosa en los  $\mu$ PEDs ( $\square$ ) y en soluciones a granel ( $\circ$ );

La Figura 7 ilustra un gráfico de la corriente de pico anódico contra la raíz cuadrada de la velocidad de exploración,  $v^{1/2}$ , para los experimentos CV realizados en los F-F  $\mu$ PEDs (cuadrado vacío), los S-S  $\mu$ PEDs (círculos rellenos) y en las soluciones a granel (círculos vacíos);

La Figura 8 ilustra los voltamogramas de redisolución anódica de onda cuadrada para 25 ppb de solución de Pb(II) en 0.1 M de tampón de acetato (pH 4.5) en presencia de 25 ppb de Zn(II): (A) una solución de 100  $\mu$ l colocada directamente sobre los electrodos; (B) una solución de 100  $\mu$ l añadida a los  $\mu$ PEDs estancados (sin una almohadilla de papel secante como colector); (C, D) una solución de analitos que absorbe de manera continua el canal de papel de los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos. El tiempo de deposición fue de 120 s (A, B, C) o 360 s (D);

La Figura 9 ilustra: (a) los voltamogramas de redisolución anódica de onda cuadrada para el análisis de la traza de Pb (II) en 0.1 M de tampón de acetato (pH 4.5) en presencia de Zn(II) (relación molar 1:1 de Pb(II) a Zn(II)) en los  $\mu$ PEDs con una solución de analitos que se absorbe continuamente a lo largo del canal de papel. Las concentraciones (ppb) de Pb(II) (ascendente a lo largo del eje y) son 5, 10, 25, 50 y 100. Los datos no se suavizan. (b) Los gráficos de calibración resultantes para el análisis de la traza de Pb(II): una solución de 100  $\mu$ l de analitos colocada en los electrodos ( $\circ$ ), y una solución de analitos que se absorbe continuamente a lo largo del canal de papel en los  $\mu$ PEDs ( $\square$ );

La Figura 10 ilustra reacciones electroquímicas reversibles que usan Au como electrodos en los  $\mu$ PEDs.

#### Descripción detallada

En un aspecto, se describe un dispositivo microfluídico y electroquímico. El dispositivo microfluídico y electroquímico comprende un primer ensamble de electrodo y una primera capa hidrófila porosa. El primer ensamble de electrodo comprende una primera capa de sustrato que soporta uno o más electrodos. En algunas modalidades, el dispositivo microfluídico y electroquímico comprende además un segundo ensamble de electrodo que comprende una segunda capa de sustrato que soporta uno o más electrodos. En algunas modalidades, el primer o segundo ensamble de electrodo comprende además un material de barrera que rodea al menos una porción del electrodo. En algunas modalidades, el electrodo se rodea substancialmente por el material de barrera. En algunas modalidades, la primera o segunda capa de sustrato tiene una estructura de dos capas que comprende un papel o película de plástico y una capa del material de barrera. En algunas modalidades específicas, el material de barrera comprende un material fotorresistente polimerizado dispuesto sobre la capa de soporte y que rodea substancialmente el electrodo. En otras modalidades específicas, el material de barrera comprende una lámina impermeable a fluidos que tiene aberturas de una dimensión para recibir el electrodo. La lámina impermeable a los fluidos se coloca sobre la primera o segunda capa de sustrato y rodea substancialmente el electrodo. En algunas modalidades específicas, la lámina impermeable a los fluidos comprende una cinta adhesiva de doble cara. En otras modalidades, la primera o segunda capa de sustrato son integrales y forman un cuerpo unitario con el material de barrera. El material de barrera proporciona una barrera al flujo de fluido y puede evitar el mal funcionamiento del dispositivo electroquímico, por ejemplo, al cortocircuitar los electrodos.

La primera capa hidrófila porosa se superpone con el ensamble de electrodo, en donde la capa hidrófila comprende una barrera impermeable a los fluidos que permea substancialmente el grosor de la capa hidrófila y define un límite de uno o más canales hidrófilos dentro de la capa hidrófila, en donde uno o más canales hidrófilos comprenden una primera región hidrófila que está en comunicación fluidica con uno o más electrodos.

En un aspecto, un dispositivo microfluídico y electroquímico descrito en la presente descripción se describe con referencia a la Figura 1 y muestra los principios generales del dispositivo. La Figura 1(a) ilustra esquemáticamente una vista en perspectiva de un dispositivo microfluídico y electroquímico 100 que incluye un ensamble de electrodo 110 y una capa hidrófila porosa con patrones 107. El ensamble de electrodo 110 comprende una capa de sustrato 103 que soporta los electrodos 101. El ensamble de electrodo comprende además un material de barrera 102 dispuesto entre los electrodos 101. En algunas modalidades, el material de barrera 102 rodea al menos una porción de los electrodos 101. En algunas modalidades, los electrodos 101 se rodean substancialmente por el material de barrera 102. En algunas modalidades específicas, el material de barrera 102 comprende un material fotorresistente polimerizado dispuesto sobre la capa de soporte 103 y que rodea substancialmente los electrodos 101. En otras modalidades específicas, el material de barrera 102 comprende una lámina impermeable a fluidos que tiene aberturas de una dimensión para recibir el electrodo. En algunas modalidades específicas, el material de barrera 102 comprende una cinta adhesiva de doble cara. La capa hidrófila porosa con patrones 107 comprende una barrera impermeable a los fluidos 105 que permea

sustancialmente el grosor de la capa hidrófila porosa con patrones y define un límite de un canal hidrófilo 108. El canal hidrófilo 108 comprende una primera región hidrófila 104 que está en comunicación fluidica con los electrodos 101. En algunas modalidades, el dispositivo microfluídico y electroquímico comprende además una región aplicadora 106, que está en comunicación fluidica con la primera región hidrófila 104. Una vez que se deposita una muestra fluidica en la región de depósito 106, el fluido se absorberá en el canal hidrófilo 108 a través del mecanismo capilar. Una vez que la muestra alcanza la primera región hidrófila 104, el analito de la muestra entra en contacto con los electrodos dispuestos por debajo de la región hidrófila para crear una celda electroquímica. Una señal electroquímica puede medirse a través de reacciones electroquímicas realizadas a través de los electrodos 101. La Figura 1 (b) ilustra una fotografía de una vista superior del dispositivo microfluídico y electroquímico 100.

La capa de sustrato 103 en la que se construye(n) el(los) electrodo(s) 101 puede ser una capa hidrófila porosa, o una capa de plástico. En algunas modalidades, la capa de sustrato es papel. En otras modalidades, la capa de sustrato es una película de plástico. En algunas otras modalidades, la capa de sustrato 103 es integral y forma un cuerpo unitario con el material de barrera 102. A manera de ejemplo, el sustrato puede ser plástico, en el que se graban los canales para proporcionar una depresión en la que se forma el electrodo. Los electrodos pueden localizarse en el sustrato según sea necesario o deseado. A manera de ejemplo, los electrodos pueden alinearse uno junto al otro (como se muestra en la Figura 1) o frente a frente (como se muestra en la Figura 3). Se contemplan otras disposiciones de electrodos.

Los electrodos se fabrican mediante los métodos y materiales conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de material electroconductor adecuado para la construcción de electrodos sobre la capa de sustrato incluyen tinta de carbono, tinta de plata, tinta Ag/AgCl, cobre, níquel, estaño, oro o platino. En algunas modalidades, se usa tinta de carbono para construir el electrodo sobre la capa de sustrato. En otras modalidades, se usa tinta Ag/AgCl para construir el electrodo sobre la capa de sustrato. En otras modalidades, se usa oro para construir el electrodo sobre la capa de sustrato. En algunas modalidades específicas, la tinta de carbono se imprime por serigrafía sobre una capa de papel como la capa de sustrato. En otras modalidades específicas, la tinta de carbono se imprime por serigrafía sobre una capa de película de poliéster como la capa de sustrato. En otras modalidades específicas, la tinta de carbono se imprime por serigrafía sobre una capa de película de poliéster como la capa de sustrato. En aún otras modalidades específicas, la tinta Ag/AgCl se imprime por serigrafía sobre una capa de papel como la capa de sustrato. En aún otras modalidades específicas, la tinta Ag/AgCl se imprime por serigrafía sobre una capa de película de poliéster como la capa de sustrato.

Las capas hidrófilas porosas que pueden usarse en los dispositivos microfluídicos y electroquímicos descritos en la presente descripción incluyen cualquier capa hidrófila que absorbe los fluidos por acción capilar. En una o más modalidades, la capa hidrófila porosa es papel. Los ejemplos no limitantes de capas hidrófilas porosas incluyen papel cromatográfico, papel de filtro, nitrocelulosa y acetato de celulosa, papel celulósico, papel de filtro, toallas de papel, papel higiénico, papel tisú, papel de cuaderno, KimWipes, toallitas húmedas VWR Light-Duty, toallitas húmedas Technicloth, periódico, cualquier otro papel que no incluya aglutinantes, tela y película polimérica porosa. En general, puede usarse cualquier papel que sea compatible con el método de formación de patrones seleccionado. En ciertas modalidades, las capas hidrófilas porosas incluyen el papel de cromatografía Whatman No. 1.

En una o más modalidades, la capa hidrófila puede diseñarse al seguir los procedimientos descritos en, *p. ej.*, WO 2008/049083 y WO 2009/121037. En ciertas modalidades, el papel hidrófilo se impregna en material fotorresistente y se usa fotolitografía para modelar el material fotorresistente para formar las barreras al seguir los procedimientos descritos en la patente núm. WO 2008/049083. El material fotorresistente usada para diseñar el material hidrófilo poroso incluye material fotorresistente SU-8, material fotorresistente SC (Fuji Film), poli(metilmetacrilato), casi todos los acrilatos, poliestireno, polietileno, cloruro de polivinilo y cualquier monómero fotopolimerizable que forme un polímero hidrófobo.

Otros materiales hidrófilos tales como nitrocelulosa y acetato de celulosa se usan comúnmente y las membranas bien conocidas para su uso en diagnóstico de fluidos, pero no son compatibles con disolventes usados típicamente en fotolitografía. En algunas otras modalidades, el papel hidrófilo con patrones se fabrica mediante el uso del método ilustrado en la Solicitud PCT en tramitación, titulada "Methods Of Micropatterning Paper-Based Microfluidics," presentada el 8 de marzo de 2010, la Publicación de patente núm. WO 2010102294 A1. Otros métodos, tales como tamizado, estampado o impresión, son adecuados para formar patrones en tales materiales. Además, la capa hidrófila y las regiones de barrera impermeables a los fluidos podrían prepararse mediante el uso de materiales que son compatibles con las condiciones de prueba, *p. ej.*, temperatura, pH y/o fuerza iónica.

Después del proceso de formación de patrones, la capa hidrófila porosa con patrones resultante contiene uno o más canales hidrófilos definidos que permite que los microfluidos fluyan por acción capilar.

Fabricación del dispositivo microfluídico y electroquímico

En algunas modalidades, el ensamble de electrodo incluye un material de barrera y una película de papel o de plástico. En un método ilustrativo, se fabrica un dispositivo microfluídico y electroquímico, al hacer primero una plantilla mediante el uso de una capa impermeable a los fluidos. La plantilla hecha de la capa impermeable a los fluidos puede hacerse mediante el uso de cualquier método conocido comúnmente en la técnica. En algunas modalidades, la plantilla se diseña mediante un software de computadora y después se corta mediante un cortador láser. En algunas modalidades,

la plantilla se hace de un tipo de doble cara y se diseña por software de computadora como Adobe Freehand®. La plantilla se corta entonces en la configuración diseñada mediante el uso de un cortador láser. A continuación, la plantilla se une a una capa de sustrato con áreas predeterminadas expuestas de la capa de sustrato. Las áreas expuestas definen la ubicación de los electrodos del ensamble de electrodo.

La plantilla puede servir como un material de relleno entre electrodos y también puede proporcionar una barrera al flujo de fluido en el espacio entre electrodos que podría impedir el proceso de medición. En una o más modalidades, la plantilla se prepara a partir de un material impermeable a los fluidos tal como una lámina de plástico. En ciertas modalidades, la capa impermeable a los fluidos es una lámina o cinta adhesiva. Entre los ejemplos no limitantes de la capa impermeable a los fluidos se incluyen la cinta adhesiva de doble cara Scotch®, las barreras impermeables al agua incluyen la cinta de doble cara 3M, la cinta de doble cara Tapeworks, la cinta de doble cara negra CR Laurence, la cinta de doble cara 3M Scotch Foam Mounting, la cinta de doble cara 3M Scotch (transparente), la cinta de empalme QuickSeam, la cinta de costura de doble cara, la cinta de doble cara resistente a la intemperie para exterior 3M, la cinta de doble cara de PVC transparente CR Laurence CRL, la cinta de doble cara Pure Style Girlfriends Stay-Put, la cinta adhesiva de doble cara Duck Duck y la cinta de doble cara Electriduct.

En algunas modalidades, a continuación se construyen uno o más electrodos sobre las áreas expuestas de la capa de sustrato. En algunas modalidades específicas, el material electroconductor se imprime por serigrafía sobre las áreas expuestas de la capa de sustrato para formar el electrodo. En algunas modalidades, el(los) electrodo(s) se imprime(n) por serigrafía sobre la capa de sustrato. En otras modalidades, pueden usarse otros métodos de construcción de los electrodos sobre la capa de sustrato. Los ejemplos no limitantes de construcción de los electrodos en la capa de sustrato incluyen deposición de metal (tal como pulverización catódica y deposición catódica, deposición de vapor, revestimiento por pulverización térmica y técnicas de haz de iones), revestimiento por electrodeposición, grabado y autoensamblaje. En algunas otras modalidades, la tinta conductiva se usa para rellenar la abertura de la plantilla. Opcionalmente, la capa de sustrato puede someterse a un calentamiento que facilite el secado de la tinta. Subsecuentemente, puede eliminarse la capa protectora del tipo de doble cara y una capa hidrófila porosa con patrones que contiene una primera región hidrófila puede unirse sobre el tipo de doble cara de manera que permita que la primera región hidrófila entre en contacto con al menos una porción del electrodo.

En otras modalidades, la capa de sustrato es integral y forma un cuerpo unitario con el material de barrera. Los ejemplos no limitantes de fabricación de dicha capa de sustrato incluyen el grabado de una película que comprende un material plástico u otro material adecuado para el método de grabado para formar canales para proporcionar una depresión en la que se forma el electrodo.

#### Configuración de los electrodos

En algunas modalidades, los electrodos comprenden un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo. La Figura 1 muestra una disposición de los electrodos en los que los tres electrodos están uno junto al otro en un único ensamble de electrodo. Dicha disposición de electrodo puede denominarse la disposición uno junto al otro ("S-S").

La Figura 2 ilustra un dispositivo microfluídico y electroquímico 200 con una disposición de los electrodos donde el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se colocan frente a frente ("F-F"). El dispositivo microfluídico y electroquímico 200 se construye mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. La Figura 2(b) ilustra una vista lateral en sección transversal del dispositivo. Como muestra la Figura 2(b), un ensamble de electrodo 211 con una estructura de dos capas que comprende un electrodo de referencia 201, un electrodo de trabajo 202, una capa de sustrato 209, *p. ej.*, una capa de poliéster o una capa de papel 209 sobre la que se disponen los electrodos y un material de barrera 208 situado al menos entre el electrodo de referencia 201 y el electrodo de trabajo 202. En algunas modalidades, el material de barrera comprende una lámina impermeable a los fluidos 208 que tiene aberturas de una dimensión para recibir el electrodo, donde la lámina impermeable a los fluidos se dispone sobre la capa de sustrato y que rodea sustancialmente al electrodo. Los ejemplos no limitantes de la lámina impermeable a los fluidos incluyen cinta adhesiva de doble cara. La Figura 2(b) ilustra también un segundo ensamble de electrodo 212 que comprende una segunda capa de sustrato 206 que soporta un contraelectrodo 205. El material de barrera 207 rodea al electrodo 205. Una capa hidrófila con patrones 210 se dispone entre el ensamble de electrodo superior 212 que aloja el contraelectrodo 205 y el ensamble de electrodo inferior 210 aloja el electrodo de trabajo 202 y el electrodo de referencia 201. La capa hidrófila 212 incluye un canal hidrófilo 204 y una región de barrera hidrófoba 203. La capa de sustrato 206 que contiene el contraelectrodo 205 se une a un lado de la capa hidrófila 210 por medio de una plantilla impermeable a los fluidos 207. La capa de sustrato 209, que contiene el electrodo de referencia 201 y el electrodo de trabajo 202, se une al otro lado de la capa hidrófila 210 a través de una capa impermeable hidrófoba de plantilla 208. El dispositivo se construye de manera que el contraelectrodo 205 y el electrodo de trabajo 202 se enfrentan entre sí. Tal disposición de electrodo se denomina disposición frente a frente ("F-F"). Sin ligarse a ninguna teoría específica, se cree que la configuración F-F tendrá un área de superficie efectiva más alta para que se produzcan reacciones electroquímicas que la configuración S-S, puesto que las reacciones electroquímicas tienen lugar entre las caras de los dos electrodos. En comparación, la configuración S-S permitirá un área superficial efectiva más pequeña. En la Figura 2(a) se muestra una vista superior del dispositivo F-F 200, que demuestra que el contraelectrodo 205 y el electrodo de trabajo 202 están uno frente al otro lo que resulta en un área de superficie de reacción electroquímica grande.

5 En algunas otras modalidades, la primera o segunda capa de sustrato son integrales y forman un cuerpo unitario con el material de barrera. Por consiguiente, el material de barrera 209 y la capa de sustrato 208 forman un cuerpo unitario. En algunas otras modalidades, similarmente, el material de barrera 207 y la capa de sustrato 206 forman un cuerpo unitario.

#### Dispositivo microfluídico y electroquímico con un colector de fluido

10 En algunas modalidades, se describe un dispositivo microfluídico y electroquímico con un colector de fluido. El colector de fluido está en comunicación fluidica con un extremo del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila dentro de la capa hidrófila porosa con patrones y funciona como colector para permitir que la muestra fluidica fluya continuamente a través de la primera región hidrófila y pase a través de los electrodos. Sin ligarse a ninguna teoría específica, se cree que el flujo fluidico continuo que pasa por los electrodos puede dar como resultado un mayor volumen de muestra que se pone en contacto con la superficie de los electrodos, lo que resulta de esta manera en un  
15 dispositivo microfluídico y electroquímico con una mayor sensibilidad y reproducibilidad. El colector de fluido incluye cualquier capa hidrófila que absorbe los fluidos por acción capilar. El colector de fluido puede ser cualquiera del material usado para las capas porosas hidrófilas descritas en la presente descripción. En una o más modalidades, el colector de fluido es uno de los canales o regiones hidrófilas dentro de la capa hidrófila porosa con patrones. En otras modalidades, el colector de fluido es papel. En otras modalidades, el colector de fluido es una almohadilla de papel secante de  
20 celulosa.

Un dispositivo microfluídico y electroquímico 300 con un colector de fluido 301 se describe con referencia a la Figura 3. La Figura 3(a) muestra una vista esquemática simplificada del dispositivo 300. El electrodo de referencia 305, el contraelectrodo 303 y el electrodo de trabajo 304 están en contacto y comunicación fluidica con una primera región hidrófila 312 dentro del canal hidrófilo 302. El canal hidrófilo 302 está en comunicación fluidica con una almohadilla absorbente 301. Durante el uso, después de que se deposita una muestra fluidica en el área inferior 313 del canal hidrófilo 302, el fluido se absorberá continuamente en la almohadilla absorbente 301, lo que genera de esta manera un gran volumen de flujo fluidico a través de los electrodos 303, 304 y 305. La Figura 3(b) muestra una vista fotográfica de un dispositivo microfluídico y electroquímico 300 con un sustrato de colector de fluido 301. La capa hidrófila con patrones 314 comprende el canal hidrófilo 302 y una región de barrera 306. Los tres electrodos 303, 304 y 305 se construyen sobre una capa de sustrato (omitida por simplificación) y se unen a la capa hidrófila con patrones 314 mediante el uso de una capa adhesiva impermeable a los fluido 307. El colector de fluido 301 está dentro de una capa 310 por debajo de la capa hidrófila 314. La capa 310 también comprende una región hidrófoba 311. En algunas modalidades, la capa 310 también puede ser una capa hidrófila con patrones y el colector de fluido 301 es uno de los canales o regiones hidrófilas dentro de la capa 311 y el área 311 comprende el sustrato hidrófobo descrito en la presente descripción.

#### Dispositivo microfluídico y electroquímico tridimensional con flujo fluidico vertical

40 En algunas modalidades, el dispositivo microfluídico y electroquímico es tridimensional lo que permite el flujo fluidico vertical además del flujo fluidico bidimensional dentro de la capa hidrófila porosa con patrones. El dispositivo microfluídico y electroquímico tridimensional comprende una capa hidrófila porosa con patrones alterna y capas impermeables al fluido además del sustrato con el(los) electrodo(s) unido(s). Las capas impermeables a los fluidos comprenden aberturas y el dispositivo microfluídico se basa en esas aberturas para dirigir el flujo microfluídico vertical en el que los canales se graban para proporcionar una depresión en la que se forma el electrodo. La capa impermeable a los fluidos puede ser una lámina que no es soluble en el fluido analizado por el dispositivo microfluídico y electroquímico y que proporciona el nivel deseado de estabilidad y flexibilidad del dispositivo. La capa impermeable a los fluidos puede comprender una o más aberturas que están en alineación con al menos una porción de los canales hidrófilos definidos dentro de la capa hidrófila porosa con patrones. Cuando esta se dispone entre la capa de sustrato con el(los) electrodo(s) y la capa hidrófila porosa con patrones que contiene la primera región hidrófila, la abertura dentro de la capa impermeable a los fluidos se alineará con ambas porciones de los electrodos y la primera región hidrófila. De esta manera, al depositar una muestra fluidica, el fluido fluye a través de los canales hidrófilos para alcanzar la primera región hidrófila, lo que resulta en su contacto con los electrodos y permite las reacciones electroquímicas apropiadas.

55 En una o más modalidades, la capa impermeable a los fluidos es una lámina de plástico. En ciertas modalidades, la capa impermeable a los fluidos es una lámina o cinta adhesiva. Entre los ejemplos no limitantes de la capa impermeable a los fluidos se incluyen la cinta adhesiva de doble cara Scotch®, las barreras impermeables al agua incluyen la cinta de doble cara 3M, la cinta de doble cara Tapeworks, la cinta de doble cara negra CR Laurence, la cinta de doble cara 3M Scotch Foam Mounting, la cinta de doble cara 3MS Scotch (transparente), la cinta de empalme QuickSeam, la cinta de costura de doble cara, la cinta de doble cara resistente a la intemperie para exterior 3M, la cinta de doble cara de PVC transparente CR Laurence CRL, la cinta de doble cara Pure Style Girlfriends Stay-Put, la cinta adhesiva de doble cara Duck Duck y la cinta de doble cara de Electriduct. En ciertas modalidades específicas, la cinta de doble cara se usa como la capa impermeable a los fluidos. La cinta de doble cara se adhiere a dos capas adyacentes de papel con patrones y puede unirse a otros componentes del dispositivo microfluídico y electroquímico. Es impermeable al agua, y aísla corrientes de fluido separadas por menos de 200  $\mu\text{m}$ . Además, también es suficientemente delgada para permitir

que las capas adyacentes de capas hidrófilas porosas entren en contacto a través de las aberturas de la cinta. Puede separarse fácilmente del papel al que se adhiere y de esta manera permitir el desmontaje de dispositivos apilados y es barato y ampliamente disponible.

5 Como alternativa a la cinta de doble cara, puede usarse un adhesivo activado por calor para sellar juntas las capas portadoras de fluido. De hecho, puede usarse cualquier material impermeable a los fluidos que pueda conformarse y adherirse a las capas hidrófilas con patrón. Además, también es posible usar el mismo material que se usa para formar patrones en las capas de papel para unir las capas de papel juntas. En una o más modalidades, una capa de material fotorresistente se dispone entre dos capas hidrófilas porosas con patrones adyacentes.

10 El dispositivo microfluídico tridimensional se describe con referencia a la Figura 4. La Figura 4(a) ilustra un dispositivo microfluídico y electroquímico tridimensional 400 ensamblado mediante el uso de capas hidrófilas porosas con patrones 410, 430, 450, las capas impermeables a los fluidos 420, 440, 460, y la capa de sustrato 470 con los electrodos 471 unidos. En algunas modalidades, las capas hidrófilas con patrones comprenden papel que comprende canales o regiones hidrófilas definidas por la barrera hidrófoba tales como material fotorresistente sobre el papel. En algunas modalidades, las capas impermeables a los fluidos comprenden cintas de doble cara que tienen aberturas para dirigir el flujo fluídico. Como se ilustra en la Figura 4(a), la primera capa de papel hidrófilo 410 comprende una región hidrófila 411 y un área hidrófoba 412 formada por material fotorresistente. Una vez que una muestra fluídica se deposita en la región hidrófila 411, el fluido puede fluir a través de la capa de cinta de doble cara 420 a través de la abertura 421 y hacia el centro del canal hidrófilo 433 dentro de la segunda capa de papel hidrófilo con patrones 430. Mediante acciones capilares, a continuación el fluido alcanzará regiones hidrófilas en forma de bloque 431. Opcionalmente, en ciertas regiones hidrófilas 432, puede depositarse un agente de filtración u otro reactivo para tratar previamente la muestra fluídica. Otros ejemplos no limitantes de reactivos de ensayo incluyen otros reactivos de ensayo de proteínas, otros reactivos de ensayo de glucosa, reactivos de ensayo de acetoacetato de sodio, reactivos de ensayo de nitrito de sodio o una combinación de los mismos. Otros reactivos de ensayo adecuados serán evidentes para un experto en la técnica.

Una vez que alcanza la región hidrófila 431, la muestra fluídica puede fluir a través de las aberturas 441 en la capa de cinta de doble cara 440 y en la primera región hidrófila 451, que está en comunicación fluídica con el electrodo 471 sobre el sustrato 470, a través de la abertura 461 de la capa de cinta 460. Parte de la muestra fluídica depositada también alcanzará la región hidrófila 473 sobre la capa de sustrato 470 al pasar secuencialmente a través de la abertura 442, la región hidrófila 452 y la abertura 462.

35 En algunas otras modalidades, se describe un dispositivo microfluídico tridimensional 500 para realizar el ensayo colorimétrico con referencia a la Figura 4(b). El dispositivo se ensambla por capas alternadas de cinta de doble cara 480, 500, 520 y papel con patrones 490, 510 y 530. Cuando una muestra fluídica se deposita en la abertura 481 de la capa de cinta 480, el fluido fluirá hacia la región central del canal hidrófilo en forma de cruz 492 sobre la capa de papel con patrones 490 definida por el material fotorresistente 491 y alcanza el borde del canal hidrófilo 493. A su vez, el fluido fluirá a través de la abertura 501 de la capa de cinta de doble cara 500 y dentro del canal hidrófilo en forma de cruz 511 más pequeño sobre la capa de papel con patrones 500. El flujo del fluido alcanza entonces el borde del canal hidrófilo 512, pasa a través de la abertura 521 de la capa de cinta 520 y llega a las regiones hidrófilas 531 sobre la capa hidrófila con patrones inferior 530. Las regiones 531 son zonas de prueba previamente marcadas con reactivos para uno o más ensayos colorimétricos. En la patente núm. WO 2009/121037, presentada el 27 de marzo de 2009 puede encontrarse una descripción más detallada del dispositivo microfluídico tridimensional para realizar el ensayo colorimétrico.

45 La incorporación de múltiples métodos de detección en un solo dispositivo microfluídico tridimensional tiene múltiples ventajas: i) extiende la gama de analitos que el dispositivo puede detectar; ii) mejora la fiabilidad del diagnóstico; iii) tiene la capacidad de detectar cuantitativamente múltiples analitos con selección óptima del método de detección para cada uno; iv) permite la integración de sensores de alta densidad; v) disminuye el costo de cada detección, ya que comparte el costo de la preparación de muestras, la introducción y los sistemas de distribución microfluídica en múltiples ensayos.

55 El dispositivo microfluídico puede usar aberturas o perforaciones dentro de la capa de separación impermeable a los fluidos para dirigir el flujo microfluídico vertical. En algunas modalidades, la abertura o perforación dentro de la capa impermeable a los fluidos se llena con un medio hidrófilo para mejorar el flujo vertical (o flujo a través). El medio hidrófilo llena la abertura dentro de la capa de separación para puentear el espacio entre las capas hidrófilas adyacentes. Como resultado, las dos regiones microfluídicas dentro de dos capas hidrófilas porosas con patrones adyacentes que se solapan parcialmente con la abertura estarán en contacto directo con el material hidrófilo en la abertura, lo que permite de esta manera un flujo microfluídico optimizado por capilaridad. En una o más modalidades, el material hidrófilo poroso sustancialmente llena el hueco dentro de la capa de separación creado por la abertura. En una o más modalidades, el material hidrófilo poroso coincide sustancialmente con la forma de la abertura. El material hidrófilo poroso que llena la abertura puede ser, por ejemplo, almohadillas de papel porosas o "puntos" que tienen un grosor similar al grosor de la capa impermeable a los fluidos. El papel puede cortarse en forma para que coincida con las dimensiones del espacio vacío creado por la abertura en la capa impermeable a los fluidos.

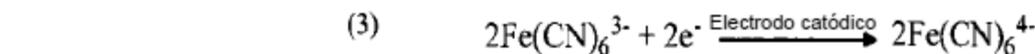
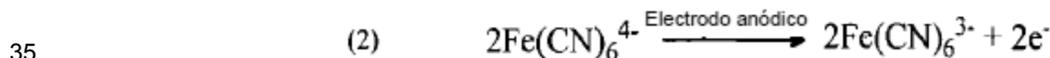
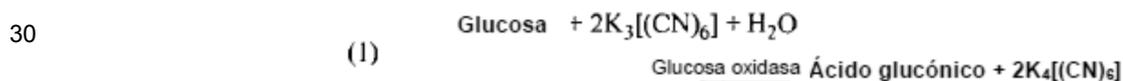
65 Como se describe en la presente descripción también se contemplan otros materiales, adecuados para su uso como la capa hidrófila porosa con patrones y la capa impermeable a los fluidos.

Métodos de detección para el análisis electroquímico mediante el uso de los dispositivos microfluídicos y electroquímicos

5 En algunas modalidades, una muestra fluidica se deposita en uno de uno o más canales hidrófilos para permitir que la muestra de fluido fluya a través del canal hidrófilo para entrar en contacto con el electrodo. En algunas modalidades, la muestra fluidica puede depositarse sobre la parte superior del electrodo. En alguna otra modalidad, la muestra fluidica se deposita en un extremo de un canal hidrófilo y se absorbe a través del canal para entrar en contacto con el electrodo. En algunas modalidades, la muestra fluidica se deposita en un extremo del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila y el dispositivo microfluídico y electroquímico comprende además un colector de fluido en comunicación fluidica con el otro extremo del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila para mantener una baja fluidica constante de la muestra fluidica a través del(de los) electrodo(s).

15 Los dispositivos electroquímicos pueden configurarse para usarse en una variedad de métodos analíticos. Los métodos no limitantes incluyen la medición de impedancia, amperometría (medición de corrientes eléctricas), biamprometría, voltamperometría de redisolución, voltamperometría diferencial, voltamperometría cíclica, coulometría y potenciometría. En algunas modalidades, los analitos dentro de la muestra fluidica se detectan por el método cronoamperométrico. En algunas modalidades específicas, el analito es glucosa. Otros ejemplos no limitantes de analito que pueden detectarse por método cronoamperométrico incluyen metabolitos tales como colesterol, ácido úrico y lactato, gases en sangre tales como oxígeno, ADN y otros analitos tales como hemoglobina, óxido nítrico y cetonas en sangre.

25 En algunas modalidades, la glucosa en la muestra se detecta mediante el uso de los dispositivos microfluídicos y electroquímicos por el método de cronoamperométrico. La cronoamperometría es una técnica electroquímica en la que el potencial del electrodo de trabajo se escalona y la corriente resultante de los procesos farádicos que ocurren en el electrodo (causada por el paso de potencial) se monitorea en función del tiempo. La información sobre la identidad de los especímenes electrolizados puede obtenerse a partir de la relación entre el pico de la corriente de oxidación y el pico de corriente de reducción. Las reacciones para la detección de glucosa son



En la primera etapa, la glucosa oxidasa catalizó la oxidación de la glucosa a ácido glucónico con reducción concomitante de Fe(III) a Fe(II) (eq 1); los iones  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  generados se detectaron cronoamperométricamente (ec 2). La reacción catódica correspondiente se describió en (ec. 3).

45 En algunas modalidades, la detección de glucosa mediante el uso de un dispositivo microfluídico y electroquímico demuestra sensibilidad y límites de detección comparables en comparación con la detección usada en las soluciones a granel. El dispositivo microfluídico y electroquímico, sin embargo, presenta varias ventajas: i) estabiliza la geometría del electrodo; ii) reduce el efecto de la convección de líquidos debido a movimientos, vibración y calentamiento aleatorios; iii) minimiza el volumen total de solución requerido para el análisis.

50 Sin pretender ligarse a ninguna teoría en particular, se cree que el uso de un dispositivo microfluídico y electroquímico confina los fluidos en el canal hidrófilo, inhibe el movimiento convectivo de fluidos y facilita de esta manera las mediciones cronoamperométricas al minimizar las perturbaciones de la capa límite estacionaria en la proximidad de los electrodos debido a la vibración, la convección térmica o basada en densidad, y otras fuentes perturbadoras. Además, el nivel normal de glucosa en orina es 0.1-0.8 mM, y 3.5-5.3 mM en sangre total. En algunas modalidades, el límite de detección de glucosa en el dispositivo microfluídico y electroquímico es de aproximadamente 0.22 mM (correspondiente a 4 mg/mL). Este valor es inferior al valor aproximado de 1.0 mM reivindicado en las especificaciones de los glucómetros convencionales.

60 En otras modalidades, los analitos dentro de la muestra fluidica se detectan y miden por voltamperometría de redisolución anódica (ASV) mediante el uso del dispositivo microfluídico y electroquímico descrito en la presente descripción. La voltamperometría de redisolución anódica es un método voltamperométrico para la determinación cuantitativa de especímenes iónicos específicos. El analito de interés se galvaniza sobre el electrodo de trabajo durante una etapa de deposición, y se oxida desde el electrodo durante la etapa de separación. La corriente se mide durante la etapa de separación. En algunas modalidades específicas, los iones de metales pesados en una muestra fluidica pueden detectarse por voltamperometría de redisolución anódica, mediante el uso del dispositivo microfluídico y

electroquímico. Los ejemplos no limitantes de iones de metales pesados incluyen mercurio, plomo, cobre, zinc, bismuto y cadmio.

5 La contaminación de los iones de metales pesados en el suelo y el agua presenta un problema global y representa una grave amenaza tanto para el ecosistema como para los seres humanos. La voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SWASV) es un método ASV frecuentemente usado para la medición de trazas de metales pesados porque reduce grandemente el ruido de fondo que viene de la corriente de carga durante la exploración de potencial. Las mediciones de ASV convencionales de iones de metales pesados se realizan usualmente mediante la inmersión de electrodos en una solución de muestra bajo condiciones de agitación controlada o mediante la colocación de una gotita de muestra sobre los electrodos. El primer enfoque no es práctico en las mediciones de campo debido a la dificultad de sincronizar los procedimientos de agitación y la ASV. El último muestra una sensibilidad limitada de la medición porque la preacumulación de analitos en la separación se limita por difusión. Adicionalmente, en este caso, usualmente se requieren nuevos electrodos para cada medida, ya que es difícil eliminar el residuo de metales depositados en una gota de solución estancada antes del siguiente ciclo de la ASV.

15 En algunas modalidades, los iones de metales pesados se detectan mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV) mediante el uso del dispositivo microfluídico y electroquímico descrito en la presente descripción. En algunas modalidades específicas, el Pb(II) se detecta mediante el uso del dispositivo microfluídico y electroquímico descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, se incluye un colector de fluido en los dispositivos microfluídicos y electroquímicos. En algunas modalidades específicas, el colector de fluido es una almohadilla de papel secante de celulosa como un colector en la salida del canal hidrófilo (véase la Figura 3). El uso de una almohadilla absorbente permite que la absorción continua de fluidos pase a través de los electrodos, y facilita el enchapado de metales, así como la limpieza de los electrodos. En algunas modalidades, el tamaño del papel secante de celulosa se ajusta para optimizar el tiempo de absorción de fluidos en el canal hidrófilo de manera que el flujo se detenga antes de que el sistema entre en la etapa de equilibrado en el proceso de SWASV, lo que resulta en una mayor sensibilidad y reproducibilidad de la medición. Sin pretender ligarse a ninguna teoría en particular, se cree que la sensibilidad mejorada puede atribuirse a la alta eficiencia de la acumulación de metales sobre los electrodos por convección de los fluidos que fluyen en los canales hidrófilos porosos sobre los electrodos y al gran volumen (~ 800  $\mu$ L) de muestra que fluye a través de la superficie de los electrodos.

20 El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar la invención, que no pretende ser limitante de la invención, cuyo alcance se expone en las reivindicaciones que siguen.

#### 35 Reactivos químicos

Se adquirieron de Ercon Inc (Wareham, MA) tinta de carbono (E3456) y tinta Ag/AgCl (AGCL-675C), y Compuesto Conductivo (Hudson, NH), respectivamente. Se adquirieron de Aldrich glucosa oxidasa (136,300 U/mg, *Aspergillus nigger*), y ferrocianuro de potasio y se usaron tal como se recibieron. Se prepararon soluciones madre de  $\beta$ -D-glucosa en un tampón PBS (pH 7.0) y se dejaron mutarrotar durante la noche antes de su uso. Se obtuvieron de Aldrich, EE.UU., soluciones estándar de absorción atómica de Pb(II) ( $10^4$  mg/L), Zn(II) ( $10^3$  mg/L), y Bismuto(III) ( $10^3$  mg/L) y se diluyeron según se requirió. Se usó 0.1 M de tampón de acetato (pH 4.5) como electrolito de soporte.

#### Aparato

45 Todas las mediciones cronoamperométricas se realizaron con un bipotenciostato (PINE Instrument Company, Modelo AFCBP1). Se usó un sistema electroquímico modular AUTOLAB equipado con PGSTAT12 en combinación con el software GPES (Eco Chemie) para las mediciones voltamperométricas de redisolución anódica de los iones de metales pesados.

#### 50 Fabricación de los dispositivos

##### Electrodos

55 Se fabricó un dispositivo electroquímico de papel microfluídico ( $\mu$ PEDs) mediante tinta de carbono de serigrafía (o tinta Ag/AgCl para un electrodo de referencia) sobre un trozo de papel o una película de poliéster. Se generó una plantilla para la impresión mediante el diseño de patrones de electrodos mediante el uso de Adobe Freehand®, seguido por el corte del patrón en cinta adhesiva de doble cara mediante el uso de un cortador láser (VersaLASER VLS3.50, Universal Laser Systems Inc.). La plantilla se pegó con cinta adhesiva en la parte superior de un sustrato de papel o plástico y las aberturas de la plantilla se llenaron con tinta. Los electrodos se hornearon en una placa caliente a 100 °C durante 30 minutos. Después de que se secó la tinta, la capa de refuerzo protector de la cinta se retiró y la capa adhesiva sobre el sustrato para el ensamblaje de un canal de papel se dejó en la parte superior de los electrodos. El grosor de los electrodos fue de aproximadamente 100  $\mu$ m. Un electrodo de trabajo y un contraelectrodo típicos tuvieron dimensiones de 1.5 cm de longitud y 4 mm de ancho, y un electrodo de referencia típico tuvo dimensiones de 1.5 cm de longitud y 3 mm de ancho.

##### 65 Canales microfluídicos

Las capas de papel hidrófilo con patrones se construyeron al seguir los procedimientos descritos en la patente núm. WO 2008/049083. Los patrones para los dispositivos microfluídicos de papel se diseñaron mediante el uso del editor de diseños CleWin. Específicamente, los canales microfluídicos de papel se fabricaron mediante la formación de patrones en el papel de cromatografía (Whatman 1 Chr) o papel de mezcla de poliéster/celulosa (VWR®Spec-Wip) por  
 5 fotolitografía o impresión de cera. Brevemente, un trozo de papel se empapó con un material fotorresistente SU-8 2010, se horneó a 95 °C durante 5 minutos para eliminar los disolventes, y se sometió a fotoexposición a la luz UV durante 10 s a través de una fotomáscara. El material fotorresistente no polimerizado se retiró al remojar el papel en acetona y lavar tres veces con isopropanol. Los polímeros que formaron patrones en el papel forman barreras hidrófobas para confinar  
 10 líquidos en el microcanal. El canal microfluídico de papel tuvo dimensiones de 4 mm de ancho y 100 µm de altura (determinada por el grosor del papel), Figura 1. Los canales de papel se ensamblaron sobre los electrodos mediante el uso de cintas adhesivas de doble cara. El área de contacto entre un canal de papel y un electrodo de trabajo fue de 4 mm por 4 mm.

#### Mediciones cronoamperométricas

Se realizaron experimentos cronoamperométricos mediante el uso de un potencial de paso de 500 mV (frente a un electrodo de pseudoreferencia de carbono) para generar la curva de calibración; estos experimentos usaron glucosa con concentraciones de 0 a 22.2 mM (correspondiente a 400 mg/dL). Se midieron soluciones (glucosa oxidasa 250 U/mL,  $K_3[Fe(CN)_6]$  600 mM de KCl, 1.0 M en tampón PBS pH 7.0) que contenían glucosa con diferentes concentraciones  
 20 (cada muestra se examinó ocho veces). La solución de enzima se manchó en la parte superior del microcanal de papel. La solución de enzima se distribuyó uniformemente en el canal de papel debido a la absorción capilar. Después de secar la solución, la enzima se absorbió uniformemente en el papel. Cuando se añadió una solución de analitos en el microcanal, la solución se distribuyó y se mezcló bien con la enzima precargada. En otro conjunto de experimentos, la solución de enzima se premezcló con muestras de glucosa antes de las mediciones cronoperimétricas. No se observó ninguna diferencia evidente entre los dos métodos. El papel también puede modificarse fácilmente para inmovilizar las  
 25 enzimas si es necesario. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente bajo condiciones ambientales. Se usó un electrodo de trabajo de carbono (sobre un sustrato plástico) con un área superficial de 16 mm<sup>2</sup> en contacto con el fluido para la detección de glucosa en la solución a granel. Se registró una media de las ocho mediciones de lectura de corriente y se calculó la desviación estándar correspondiente.

#### Voltamperometría de redisolución anódica

Las mediciones voltamperométricas de redisolución se realizaron mediante deposición *in situ* del bismuto (500 µg/L) y los iones metálicos objetivos con concentraciones de 0 a 100 ppb (µg/L). Se usaron soluciones no desaireadas para todas las mediciones, y cada muestra se midió ocho veces. Todas las mediciones se realizaron mediante el uso de la voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SWASV) con una frecuencia de 20 Hz, un paso potencial de 5 mV y una amplitud de 25 mV. Los experimentos SWASV comprendieron una etapa de deposición electroquímica a -1.2 V durante 120 s, un período de equilibrio de 30 s y una exploración voltaperométrica de redisolución de onda  
 35 cuadrada generalmente de -1.2 a -0.5 V. Antes de cada medición se realizó una etapa de acondicionamiento (para limpiar el electrodo) a un potencial de +0.5 V durante 60 s.

Para la medición de iones de metales pesados en los µPEDs se usó voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada. Las mediciones de los metales traza se basaron en el enchapado simultáneo (*in situ*) de metales objetivos y bismuto sobre electrodos serigrafados de carbono, que formaron aleaciones seguidas de la redisolución anódica de metales desde el electrodo.  
 45

#### Caracterización electroquímica de los dispositivos electroquímicos de papel

Se usó ácido carboxílico de ferroceno como compuesto activo modelo redox para caracterizar el comportamiento electroquímico de los µPEDs (Figura 5a). La forma de pico de los CVs mostró una reacción electroquímica reversible típica (Nernstian) en la que la velocidad de reacción se rige por la difusión de los especímenes electroactivos a la superficie de un electrodo plano. La diferencia de potencial entre los picos de las curvas de reducción ( $E_{pc}$ ) y las curvas de oxidación ( $E_{pa}$ ) fue de 0.068 V (un valor cercano al valor teórico de 0.059 V para el par redox de ferroceno) para todas las velocidades de exploración entre 50 y 500 mV/S, y la relación de corriente pico ( $i_{pa}/i_{pc}$ ) fue igual a 1.0.<sup>14</sup> Este comportamiento reversible indicó que no se producen reacciones secundarias y que, como se esperaba, la cinética de transferencia de electrones fue suficientemente rápida para mantener las concentraciones superficiales de especies activas redox en los valores requeridos por la ecuación de Nernst.  
 55

La Figura 5b muestra que la corriente de pico anódico,  $i_p$ , fue linealmente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de exploración ( $v^{1/2}$ ) tanto en la solución a granel como en el µPED. El valor del coeficiente de difusión evaluado mediante el análisis de la pendiente observada en la solución a granel fue de  $4.3 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/seg, lo cual fue bastante similar al valor reportado de  $5.7 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/seg. La lectura de corriente (Figura 2b) medida mediante el uso del dispositivo de papel es aproximadamente 30 % menor que la medida en solución a granel. Se suponía que esta diferencia se debía al hecho de que el 30-40 % del volumen en contacto difusional con los electrodos se ocupa por la fibra de celulosa del papel. Estos resultados que contenían el espécimen redox activo, no ralentizaron la velocidad de transferencia de carga limitada en masa con relación a la solución.  
 65

## Análisis cronoamperométrico de glucosa en orina

El uso de un  $\mu$ PED en el análisis de la glucosa en la orina artificial se demostró mediante cronoamperometría. La cronoamperometría ofrece una mejor relación señal/ruido que otras técnicas electroquímicas en este tipo de experimentos y el uso de una delgada capa de fluidos sujetos mecánicamente a los electrodos es más resistente a la vibración que el análisis en un volumen mayor de solución. La medición cronoamperométrica de la transferencia de carga que refleja la corriente hacia/desde el espécimen redox activo en función del tiempo a tensiones aplicadas constantes - comienza con una corriente capacitiva inicialmente grande. Al decaer la corriente capacitiva inicial dentro de uno a dos segundos, predomina la corriente Farádica (la corriente que es proporcional a la concentración del analito). La corriente  $i$ , decae como  $t^{-1/2}$  como se describe por la ecuación de Cottrell (eq 4) donde  $n$  es el número de electrones,  $t$  es el

$$i = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (4)$$

tiempo,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área del electrodo,  $D$  es el coeficiente de difusión de los analitos, y  $C$  es la concentración inicial de los reactivos.

El  $\mu$ PED confina los fluidos en el canal de papel, inhibe el movimiento convectivo de los fluidos y facilita las mediciones cronoamperométricas al minimizar las perturbaciones de la capa límite estacionaria en la vecindad de los electrodos debido a vibración, convección térmica o basada en densidad y otras fuentes de perturbación. La Figura 6a muestra una respuesta cronoamperométrica representativa de las mediciones de glucosa mediante el uso de un  $\mu$ PED. A lo largo del intervalo de concentraciones de glucosa examinado (0-22.2 mM), todas las curvas de respuesta alcanzaron un estado estable dos segundos después del potencial escalonado (véase también el diagrama Cottrell en la información suplementaria). La Figura 6b muestra una curva de calibración para la detección de glucosa. Cuando la concentración de glucosa estaba en el intervalo de 0-22.2 mM, la corriente era linealmente proporcional a la concentración de glucosa en la orina artificial.

La interferencia del dispositivo de detección con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína globular típica; las albúminas séricas están presentes en concentraciones más elevadas en el suero y, por lo tanto, son relevantes para el bioanálisis. Se encontró que la presencia de 40  $\mu$ M de BSA no interfirió con la medición de la glucosa; esta selectividad se debe a la especificidad de la oxidación enzimática de la glucosa; la BSA aparentemente no ensucia los electrodos. Al comparar los resultados de la detección de glucosa en los  $\mu$ PEDs con los de las soluciones a granel (Figura 6b), se observó que los dos métodos mostraron sensibilidad y límites de detección comparables; la matriz de papel no interfiere con la detección. La matriz de papel en los  $\mu$ PED tiene, sin embargo, varias ventajas: i) estabiliza la geometría del electrodo; ii) reduce el efecto de la convección de líquidos debido a movimientos, vibración y calentamiento aleatorios; iii) minimiza el volumen total de solución requerido para el análisis. El nivel normal de glucosa en orina es 0.1-0.8 mM, y 3.5-5.3 mM en sangre total. Por lo tanto, el dispositivo  $\mu$ PED debe ser capaz de medir la glucosa en otros fluidos biológicos tales como suero y sangre. El límite de detección de glucosa en el  $\mu$ PED actual fue de aproximadamente 0.22 mM (correspondiente a 4 mg/mL). Este valor está por debajo de aproximadamente 1.0 mM reivindicado en las especificaciones de glucómetros convencionales, y 0.5 mM obtenido por el método de detección colorimétrico informado anteriormente. Se estimó que la sensibilidad del análisis de glucosa era de 0.43  $\mu$ A $\cdot$ mM $^{-1}\cdot$ mm $^2$ . En principio, otros especímenes en orina y sangre reales pueden interferir cuando se usan potenciales de 500 mV para el análisis de la glucosa. El potencial puede reducirse a alrededor de 300 mV para las mediciones en fluidos biológicos, gracias a la selectividad enzimática de la glucosa oxidada. El dispositivo de papel también tiene el potencial de integrarse con diversas técnicas de separación tales como cromatografía de papel para minimizar las interferencias.

## Análisis voltamperométrico de redisolución anódica de iones de metales pesados

Los iones de metales pesados como el mercurio, el plomo y el cadmio son tóxicos, no biodegradables y tienden a acumularse en plantas y animales. La contaminación de los iones de metales pesados en el suelo y el agua presenta un problema global y representa una grave amenaza tanto para el ecosistema como para los seres humanos. La voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SWASV) es un método ASV frecuentemente usado para la medición de trazas de metales pesados porque reduce grandemente el ruido de fondo que viene de la corriente de carga durante la exploración de potencial. Las mediciones de ASV convencionales de iones de metales pesados se realizan usualmente mediante la inmersión de electrodos en una solución de muestra bajo condiciones de agitación controlada o al colocar una gotita de muestra sobre los electrodos. El primer enfoque no es práctico en las mediciones de campo debido a la dificultad de sincronizar los procedimientos de agitación y ASV. Este último muestra una sensibilidad limitada de la medición porque la preacumulación de analitos en la separación se limita por difusión. Adicionalmente, en este caso, usualmente se requieren nuevos electrodos para cada medición, ya que es difícil eliminar el residuo de metales depositados en una gota estancada de solución antes del siguiente ciclo de ASV.

Se demostró que los  $\mu$ PEDs pueden usarse en la medición selectiva de Pb(II) en una mezcla acuosa de Pb(II) y Zn(II) mediante el uso de SWASV. El diseño de  $\mu$ PEDs se modificó al introducir una almohadilla de papel secante de celulosa

como un colector en la salida del canal de papel (Figura 3c). El  $\mu$ PED permitió la absorción continua de fluidos a través de los electrodos, y facilitó el enchapado de metales, así como la limpieza de electrodos. Al ajustar el tamaño del papel secante de celulosa, se optimizó el tiempo de absorción de fluidos en el canal de papel de los  $\mu$ PEDs de manera que el flujo se detuvo antes de que el sistema entrara en la etapa de equilibrio en el proceso de SWASV.

La Figura 8 muestra voltamperogramas representativos para la medición de 25 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) de Pb(II) en solución de tampón acetato en presencia de Zn(II). Los voltamperogramas en los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos, en los que el fluido de la solución de muestra se absorbe continuamente en el microcanal de papel, mostró un pico agudo bien definido para Pb(II) en *aprox.* 780 mV frente al electrodo de referencia Ag/AgCl (C y D en la Figura 8). Por el contrario, en las mismas condiciones de SWASV, una solución estancada de analitos, tanto en los  $\mu$ PEDs (sin una almohadilla de papel secante como colector) como en un experimento que colocó una gotita de solución de muestra sobre los electrodos, resultó en una señal mucho más débil (A en la Figura 8) o una respuesta pobremente definida (B en la Figura 8). Los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos mostraron de esta manera una sensibilidad mucho mayor por un factor de cinco que los sistemas estancados.

En los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos, la corriente de pico del análisis de Pb(II) aumentó dramáticamente con el aumento del tiempo de deposición (Figura 8). La corriente máxima aumentó de 3.9  $\mu\text{A}$  a 10.3  $\mu\text{A}$  con el aumento del tiempo de deposición de 120 s a 360 s. Este aumento no fue obvio en los sistemas estancados, ya que la eficiencia de deposición decae rápidamente con el tiempo debido a la reacción de transferencia de masa limitada en la proximidad de la superficie de los electrodos. Por otra parte, se encontró que los  $\mu$ PEDs estancados mostraron una señal más pobremente definida, en comparación con el sistema con una gota de solución de muestra directamente colocada en los electrodos (Figura 8). Se supone que esto se debe a que la matriz de celulosa en los  $\mu$ PEDs estancados inhibe el movimiento convectivo de las soluciones, y por lo tanto afecta el comportamiento de separación del Pb(II).

Los voltamperogramas de redisolución para el análisis de Pb(II) en los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos mostraron picos bien definidos y una señal fuerte en una amplia gama de concentraciones de Pb(II); este nivel de rendimiento ofrece una cuantificación conveniente de los bajos niveles de ppb de plomo (Figura 9a). La intensidad de pico aumentó proporcionalmente con la concentración de Pb(II), lo que produjo un gráfico de calibración altamente lineal con una pendiente de 0.17  $\mu\text{A ppb}^{-1}$  para el plomo (coeficiente de correlación, 0.996) (Figura 9b). El límite de detección de plomo se estimó a partir de las características de señal a ruido de los datos a aproximadamente 1.0 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ); este valor es incluso inferior a 2.5 ppb obtenido en sistemas convencionales con agitación controlada. Este valor es también mucho más bajo que el valor de referencia de la OMS 10 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) para la concentración de plomo en el agua potable. Se cree que incluso se podrían detectar concentraciones más bajas de plomo si se usaban periodos de deposición más largos. La medición sensible de Pb(II) en los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos es altamente reproducible, como se indica por la baja desviación estándar relativa.

El rendimiento de los  $\mu$ PEDs hidrodinámicos para el análisis de plomo se comparó con el sistema estancado, en el que se colocó una gota de solución de muestra sobre los electrodos (Figura 9b). El sistema estancado mostró una sensibilidad mucho menor de 0.05  $\mu\text{A}\cdot\text{ppb}^{-1}$  para el plomo (coeficiente de correlación, 0.978), y un mayor límite de detección de 4.3 ppb, que la medición dinámica. A diferencia del sistema estancado, pequeñas perturbaciones (*p. ej.*, vibración, calentamiento) no interfirieron con el análisis de plomo en los  $\mu$ PED hidrodinámicos debido a la estabilización del flujo de la solución de muestra por la matriz de papel; esta estabilización dio como resultado una alta fiabilidad y reproducibilidad de las mediciones. El dispositivo puede reusarse al simplemente reemplazar la almohadilla de papel secante, ya que la absorción continua elimina los analitos disueltos antes del siguiente ciclo de deposición de metales.

La optimización del arreglo de electrodos en el dispositivo de papel

Se comparó el rendimiento de la  $\mu$ PED con diferentes disposiciones del electrodo de trabajo y el contraelectrodo. La Figura 7 muestra un dispositivo de papel con otra geometría en la que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se colocaron frente a frente en la parte superior e inferior del canal de papel ("F-F  $\mu$ PED"). El dispositivo donde el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se colocaron uno junto al otro por debajo del canal de papel se denomina "S-S  $\mu$ PED".

La Figura 7 muestra la corriente de pico en experimentos CV en función de la raíz cuadrada de la velocidad de exploración,  $v^{1/2}$ . Bajo las mismas condiciones experimentales, el F-F  $\mu$ PED mostró mayores corrientes de respuesta en experimentos CV, que el correspondiente S-S  $\mu$ PED. La configuración F-F tiene probablemente un área superficial efectiva más alta para reacciones electroquímicas que la configuración S-S, ya que las reacciones electroquímicas tienen lugar entre los dos electrodos. La pendiente del gráfico del F-F  $\mu$ PED fue cercana a la de las mediciones en solución a granel. Estos resultados demuestran que la configuración de electrodos influye en el rendimiento del  $\mu$ PED, y que el material de papel no interfiere con la electroquímica. En términos de la disposición espacial de los electrodos, el flujo pasa al mismo tiempo a través del electrodo de trabajo y el contraelectrodo en el F-F  $\mu$ PED, en lugar de en secuencia como en el S-S  $\mu$ PED. Se cree que el F-F  $\mu$ PED debe mostrar un rendimiento superior en el seguimiento de la concentración de analitos que fluye continuamente en los canales de papel. La organización F-F de los electrodos también permite el embalaje compacto de los sensores que la S-S.

Rendimiento de los electrodos de oro en los dispositivos de papel

5 Otros tipos de electrodos, por ejemplo, rayas de oro recubiertas de plástico, son también adecuados para el dispositivo electroquímico de papel, y pueden usarse para aplicaciones específicas. Los dispositivos de papel con electrodos hechos de rayas de oro mostraron un excelente rendimiento en la voltamperometría cíclica, pero fueron menos robustos que los electrodos a base de carbono. La Figura 10 muestra que las reacciones electroquímicas fueron reversibles sobre los electrodos de Au en los  $\mu$ PEDs.

10

Reivindicaciones

1. Un dispositivo microfluídico y electroquímico que comprende:  
 5 un primer ensamble de electrodo que comprende una primera capa de sustrato (103) que soporta uno o más electrodos (101); y  
 una primera capa hidrófila porosa (107) que se superpone al ensamble de electrodo, en donde la capa hidrófila comprende un límite impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la capa hidrófila y define uno o más canales hidrófilos(108) dentro de la capa hidrófila, en donde uno o más canales hidrófilos comprenden una primera región hidrófila (104) que está en comunicación fluidica con uno o más electrodos.
2. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ensamble de electrodo comprende además un material de barrera que rodea al menos una porción del electrodo.
3. El dispositivo electrocrómico y microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además:  
 15 una capa impermeable a los fluidos que se superpone y entra en contacto con al menos una porción de la primera capa hidrófila; y  
 una segunda capa hidrófila porosa que se superpone y entra en contacto con al menos una porción de la capa impermeable a los fluidos, en donde la segunda capa hidrófila comprende un límite impermeable a los fluidos que permea sustancialmente el grosor de la segunda capa hidrófila y define uno o más canales hidrófilos dentro de la  
 20 segunda capa hidrófila,  
 en donde la capa impermeable a los fluidos comprende una o más aberturas en alineación y en comunicación fluidica con al menos una porción de un canal hidrófilo dentro de cada capa hidrófila.
4. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde un medio hidrófilo poroso se dispone en la abertura de la primera capa impermeable a los fluidos y está en comunicación fluidica con al menos una porción de un canal hidrófilo dentro de las capas hidrófilas.
5. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el ensamble de electrodo comprende un electrodo de trabajo y un contraelectrodo.
6. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el primer ensamble de electrodo comprende un electrodo de trabajo y el dispositivo microfluídico y electroquímico comprende además un segundo ensamble de electrodo que comprende un contraelectrodo que comprende una  
 35 segunda capa de sustrato que soporta el contraelectrodo, en donde el electrodo se rodea sustancialmente por un material de barrera.
7. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la primera capa hidrófila porosa que comprende la primera región hidrófila se dispone entre los primer y segundo ensambles de electrodo y en donde la primera región hidrófila está en comunicación fluidica con el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.
8. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además un colector de fluido, en donde el colector de fluido está en comunicación fluidica con un extremo del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila.
9. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el colector de fluido comprende un papel secante de celulosa.
10. El dispositivo microfluídico, electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el medio hidrófilo poroso comprende papel; y/o  
 50 en donde la primera o segunda capa porosa hidrófila comprende papel; y/o  
 en donde la primera o segunda capa de sustrato comprende un papel o una película de plástico.
11. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la primera o segunda capa comprende un papel o una película de plástico y un material de barrera que comprende un material fotorresistente polimerizado dispuesto sobre la película de papel o de plástico y que rodea sustancialmente el electrodo; o  
 55 en donde el dispositivo comprende un material de barrera que comprende una lámina impermeable a los fluidos que tiene aberturas de una dimensión para recibir el electrodo, dicha lámina impermeable a los fluidos dispuesta sobre la primera o segunda capa de sustrato y que rodea sustancialmente el electrodo.
12. El dispositivo microfluídico, electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la primera o segunda capa de sustrato son integrales y forman un cuerpo unitario con el material de barrera.
- 65 13. El dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el primer o segundo ensamble de electrodo comprende además un electrodo de referencia.

14. Un método para preparar un dispositivo microfluídico y electroquímico, que comprende:  
 disponer una capa de barrera hidrófoba que comprende una plantilla que incluye una o más aberturas a una  
 5 capa de soporte;  
 depositar material electroconductor en la(s) abertura(s) para formar uno o más electrodos; y  
 unir una capa hidrófila porosa que comprende una barrera impermeable a los fluidos que permea  
 sustancialmente el grosor de la capa hidrófila porosa con patrones y define un límite de uno o más canales  
 hidrófilos en la capa porosa hidrófila; en donde:  
 10 el canal hidrófilo comprende una primera región hidrófila; y la primera región hidrófila está en comunicación  
 fluidica con el(los) electrodo(s).
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además:  
 unir una o más capas hidrófilas porosas que comprenden una barrera impermeable a los fluidos que permea  
 15 sustancialmente el grosor de la capa hidrófila porosa con patrones y define un límite de uno o más canales  
 hidrófilos en la capa hidrófila porosa con patrones; y  
 disponer una segunda capa impermeable a los fluidos entre las capas hidrófilas porosas con patrones  
 adyacentes; en donde la segunda capa impermeable a los fluidos comprende una o más aberturas; y cada  
 20 abertura está en alineación y en comunicación fluidica con una o más porción(es) de uno del(de los) canal(es)  
 hidrófilo(s).
16. Un método para determinar la presencia de uno o más analitos en una muestra de fluido mediante el uso de un  
 dispositivo microfluídico y electroquímico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que  
 comprende:  
 25 depositar una muestra fluidica en uno de uno o más canales hidrófilos de la capa hidrófila porosa para  
 proporcionar el contacto fluidico de la muestra con el(los) electrodo(s); y  
 medir una señal electroquímica mediante el uso del(de los) electrodo(s).
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la señal electroquímica se correlaciona con una  
 30 concentración del(de los) analito(s); o en donde la señal electroquímica se correlaciona con la presencia del(de  
 los) analito(s).
18. El método de acuerdo con las reivindicaciones 16 o 17, en donde la muestra fluidica se deposita en una región  
 del canal hidrófilo situada sustancialmente sobre uno o más electrodos; y/o  
 35 en donde el dispositivo microfluídico y electroquímico comprende además un colector de fluido en comunicación  
 fluidica con un extremo distal del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila; y el método que  
 comprende además:  
 depositar la muestra fluidica en un extremo proximal del canal hidrófilo que comprende la primera región hidrófila;  
 en donde la muestra fluidica se transporta por acción capilar sobre el electrodo y dentro del colector de fluido; y  
 40 en donde se mantiene un flujo fluidico constante de la muestra fluidica a través del(de los) electrodo(s).
19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la medición de una señal  
 electroquímica comprende la medición de impedancia, la medición de corriente o tensión; y/o  
 45 en donde la medición electroquímica se selecciona del grupo que consiste en amperometría, biamperometría,  
 voltamperometría de redisolución, voltamperometría diferencial, voltamperometría cíclica, coulometría,  
 cronoamperometría y potenciometría; y/o  
 en donde la medición electroquímica es cronoamperometría y el analito comprende glucosa, colesterol, ácido  
 úrico, lactato, gases en sangre, ADN, hemoglobina, óxido nítrico y cetonas en sangre.

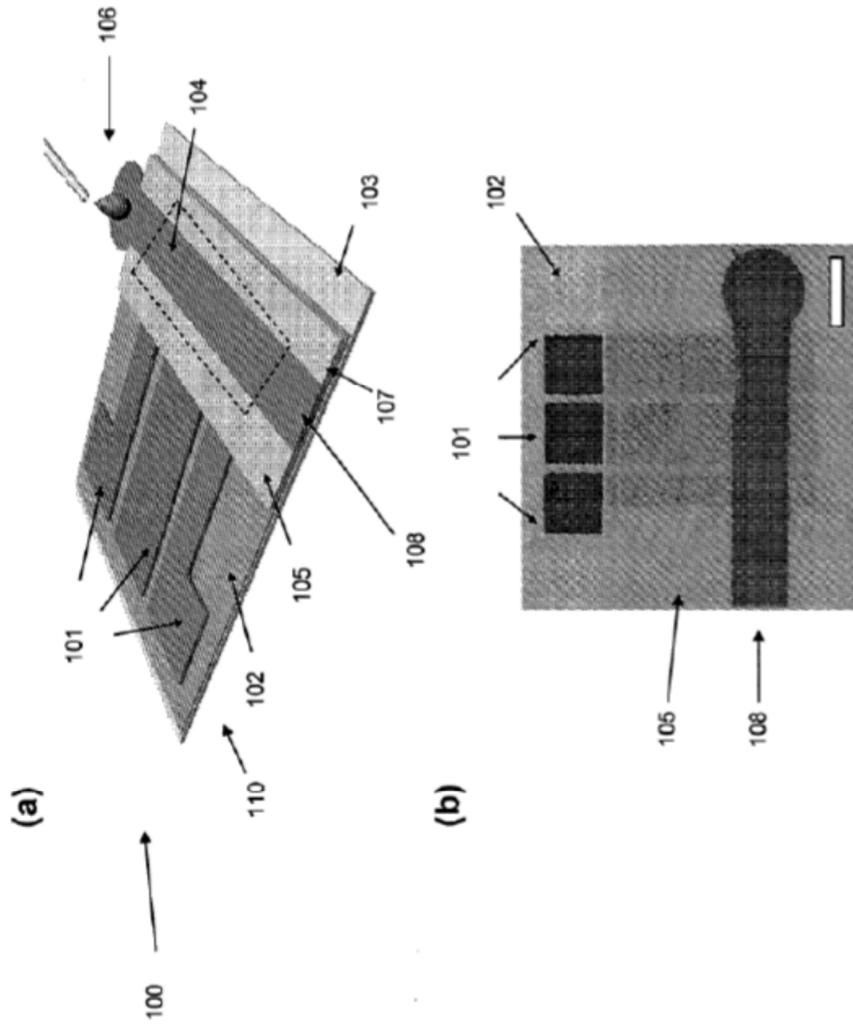


Figure 1

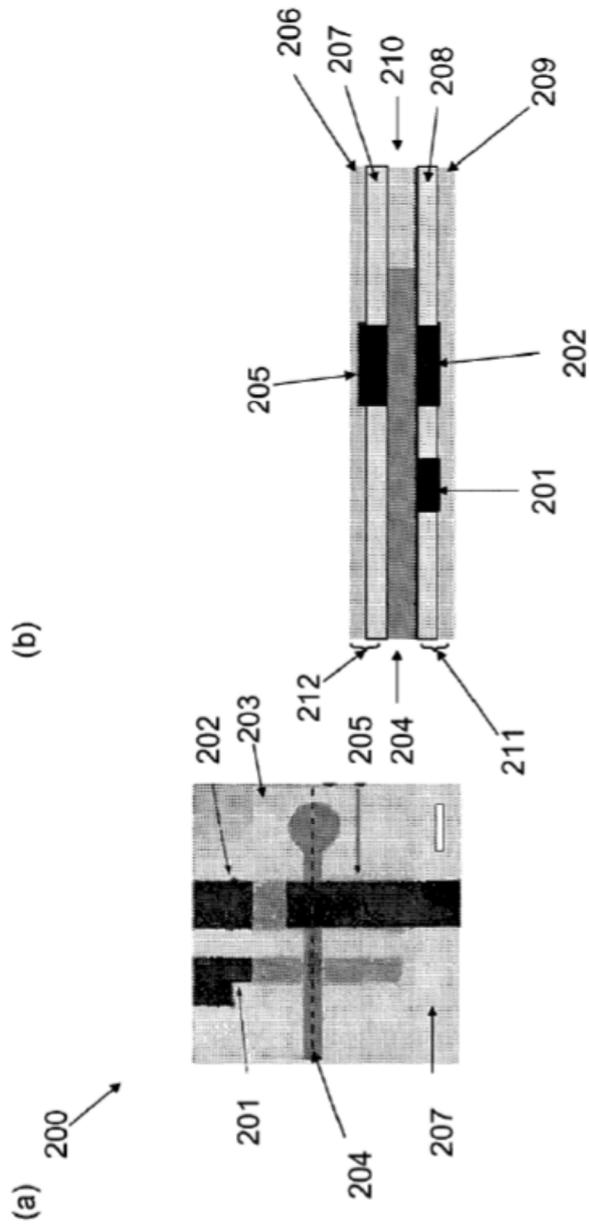


Figure 2

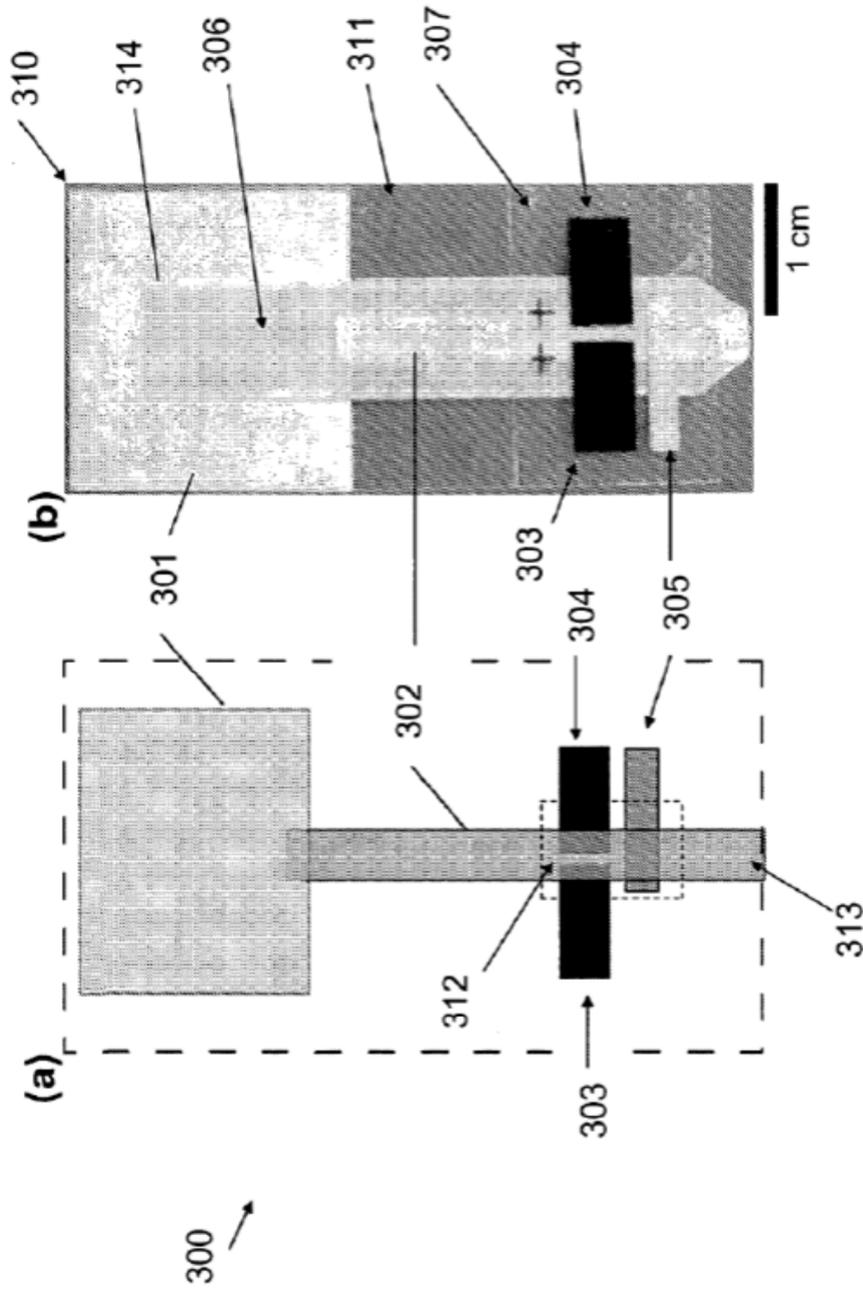


Figura 3

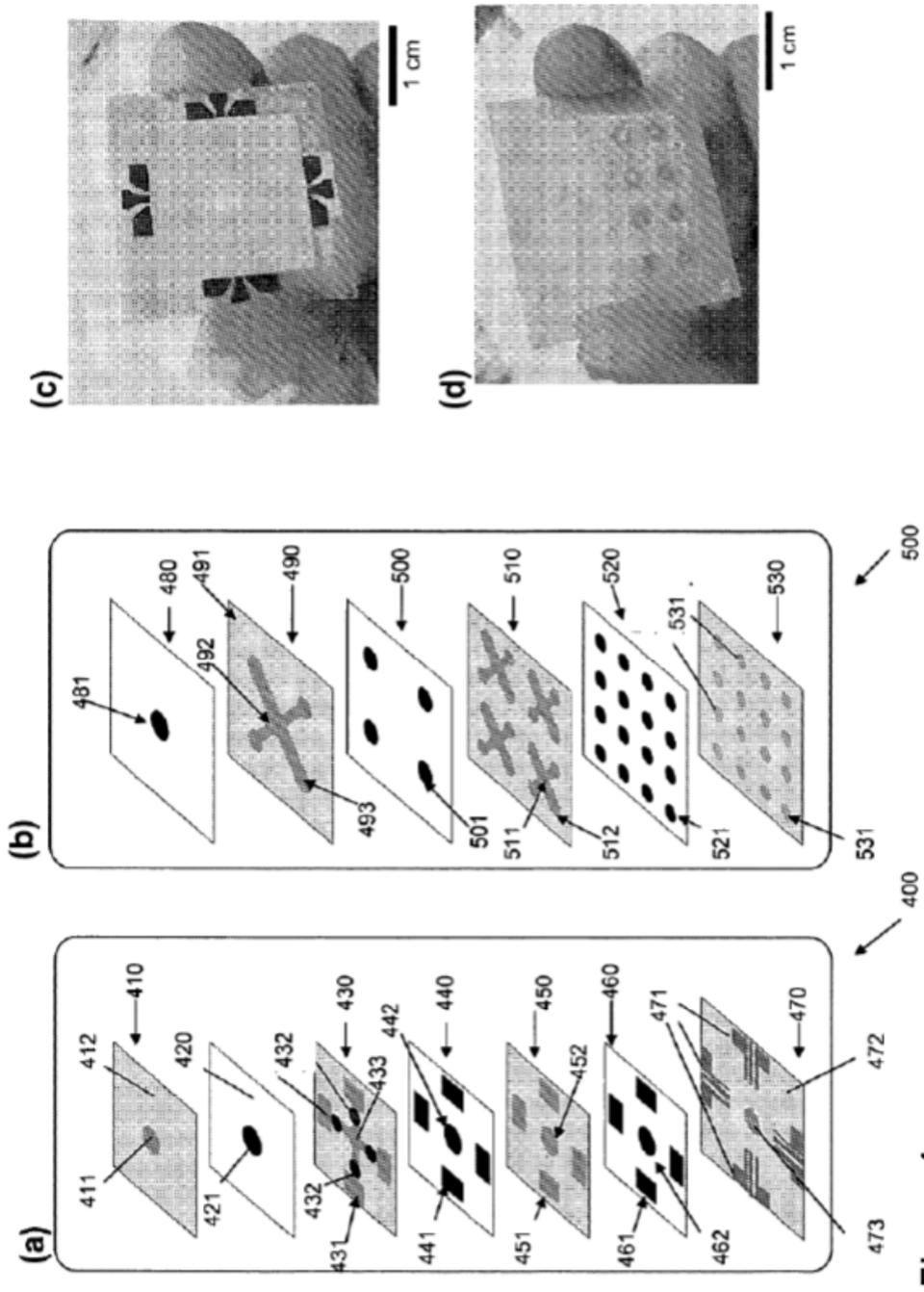


Figura 4

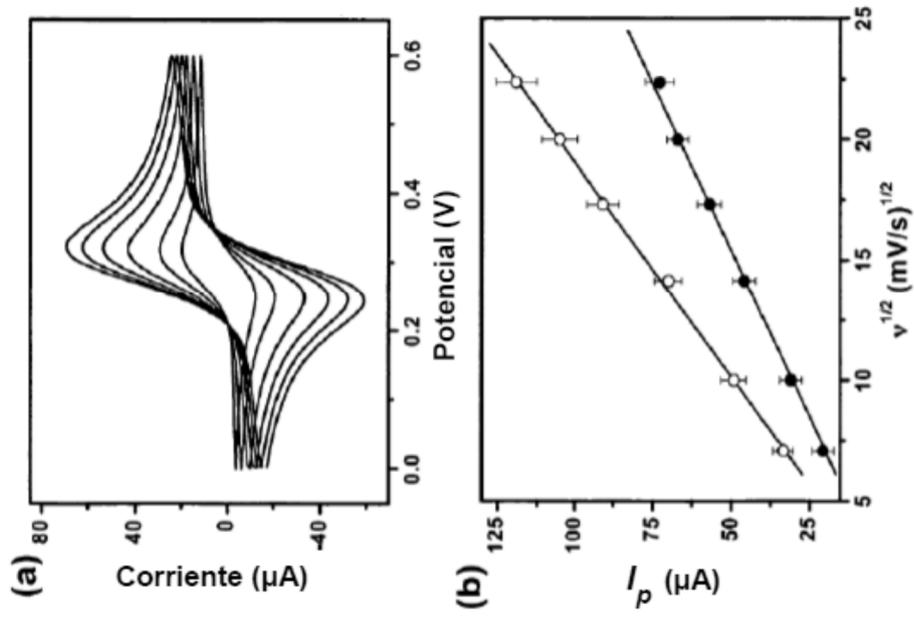


Figura 5

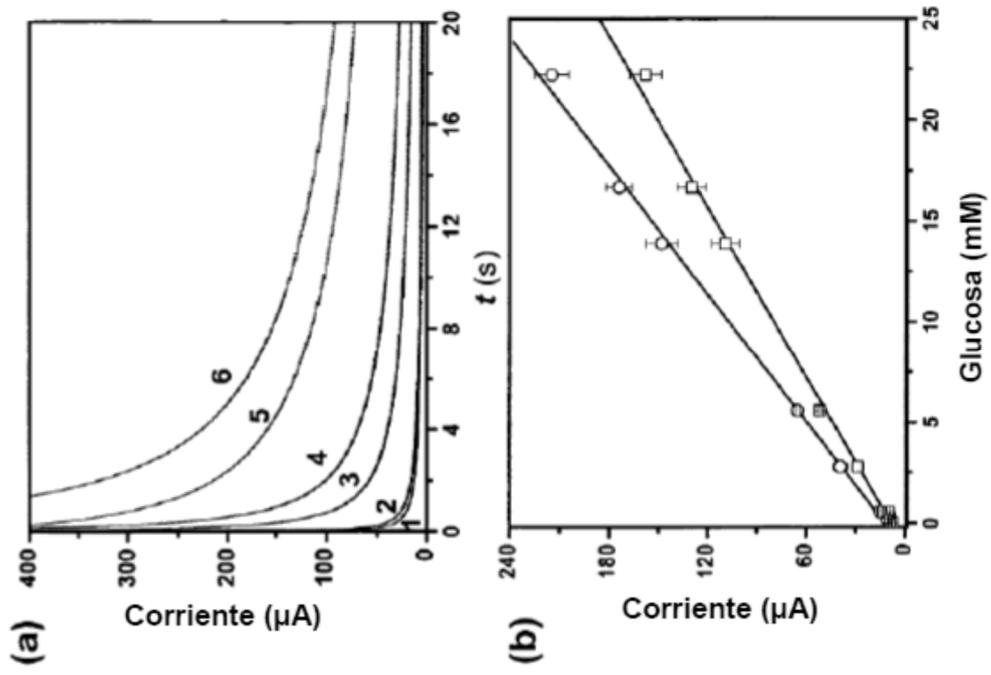


Figura 6

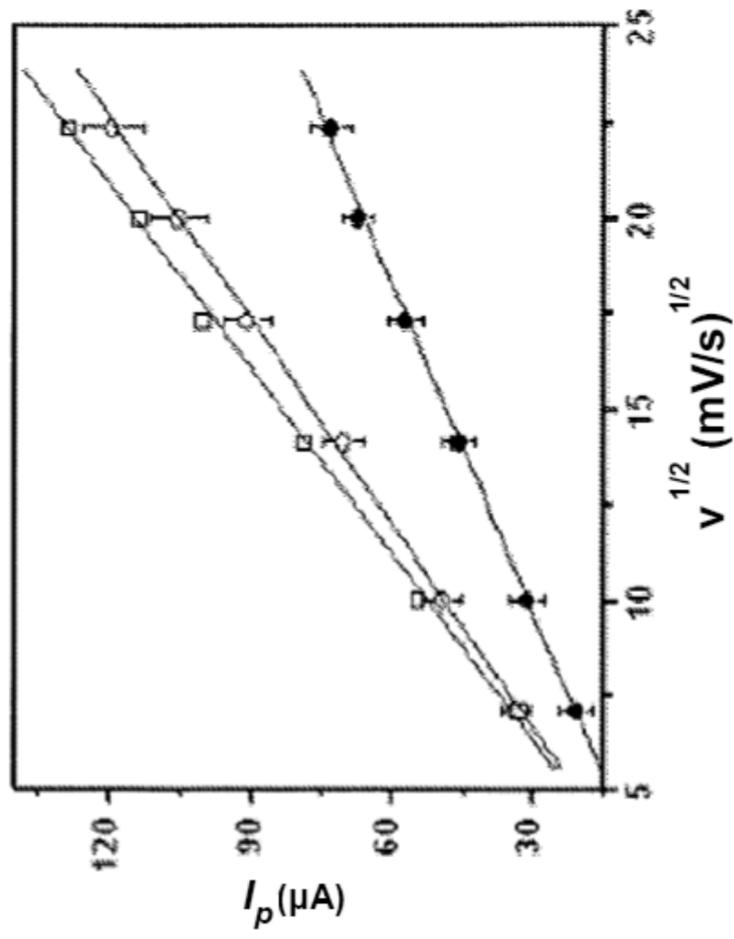


Figura 7

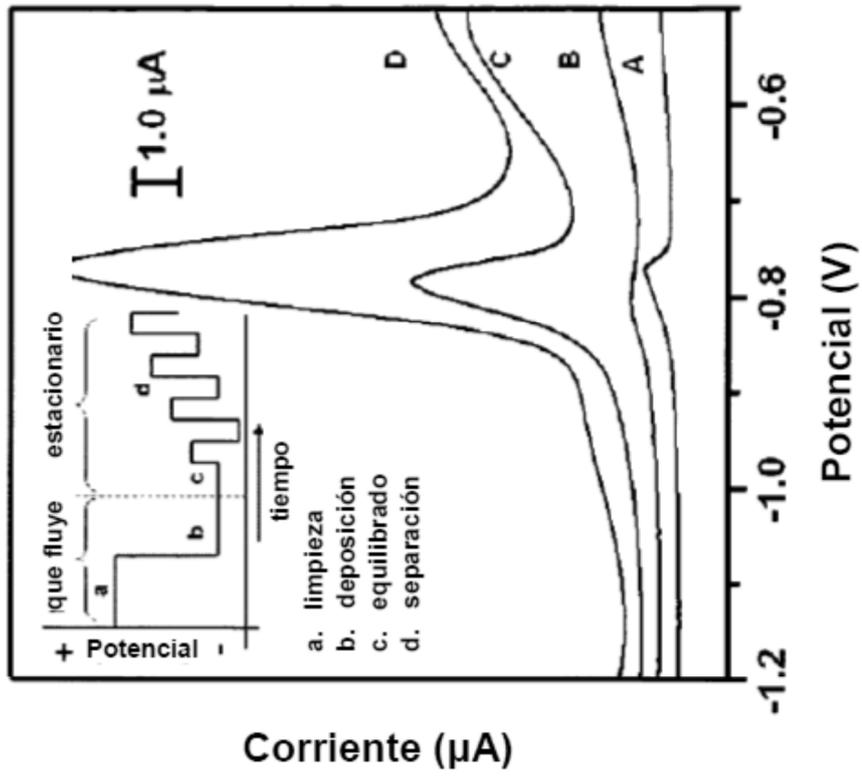


Figura 8

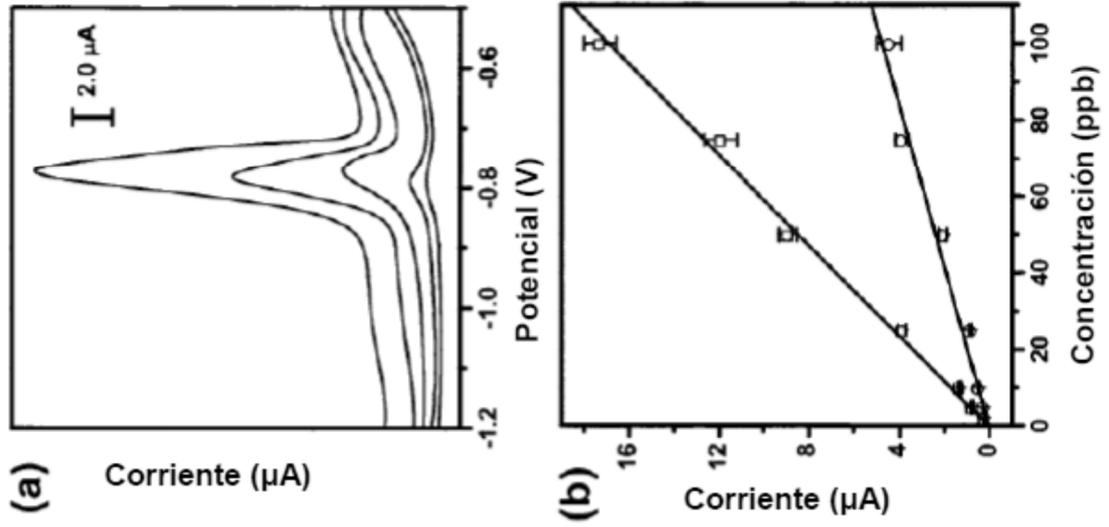


Figura 9

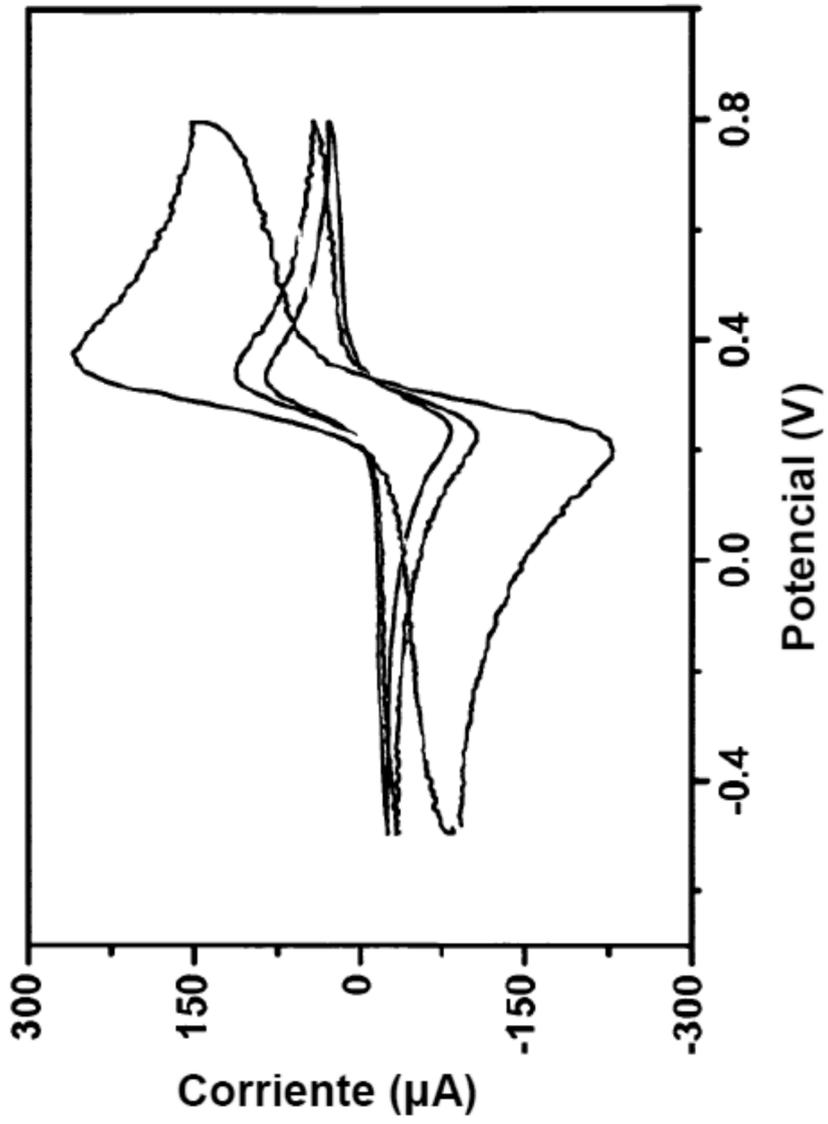


Figura 10