



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 695**

51 Int. Cl.:
G01N 27/327 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06291523 .6**
96 Fecha de presentación : **27.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1906177**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Microsensor para la detección de D-aminoácidos.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2010

73 Titular/es: **Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)**
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR
Université Claude Bernard de Lyon 1,
Université Paris XI,
Université d'Insubria y
Institut de Biologie Moléculaire et Génétique

72 Inventor/es: **Marinesco, Stéphane;**
Pernot, Pierre;
Mothet, Jean-Pierre;
Cespuglio, Raymond;
Schuvailo, Oleg;
Soldatkin, Alexey;
Pollegioni, Loredano y
Pilone, Mirella

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Microsensor para la detección de D-aminoácidos.

La presente invención se refiere al campo de los microsensors y los microdispositivos sensores.

De manera más precisa, la invención se refiere a un microsensor o microelectrodo para la medida de D-serina, y a un método electroquímico para detectar y/o medir un D-aminoácido, en particular D-serina, más específicamente *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

Existe especialmente la necesidad de sensores de D-aminoácidos que se puedan usar para la medida *in vivo*. Por ejemplo, para D-serina, que se ha demostrado recientemente que está presente en el Sistema Nervioso Central (SNC), en la corteza, el hipocampo o el cerebelo en desarrollo.

Este D-aminoácido se ha implicado recientemente en varias patologías tales como esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, dolor crónico o isquemia cerebral. Así, existe la necesidad de agentes farmacológicos capaces de interferir con la síntesis, la liberación, el catabolismo y/o el sistema de absorción de la D-serina en el SNC, así como de métodos fiables para la detección de la D-serina *in vivo* e *in vitro*.

Un método conocido para medir la concentración extracelular de D-serina es la microdialísis. Este método es pesado, caro y difícil de emplear. Además, implica el uso de sondas relativamente grandes, que pueden provocar lesiones que pueden comprometer la medida.

Además, el propio principio de este método, que comprende las etapas de dializar el medio extracelular, recogerlo y analizar su contenido, puede inducir una perturbación en la funcionalidad fisiológica de la muestra debido a la circulación de líquido extracelular exógeno, que puede cambiar la concentración local de la D-serina así como de otros metabolitos pequeños.

También se conocen métodos electroquímicos para detectar D-serina, por ejemplo en la industria alimentaria. Estos métodos usan sensores que tienen un tamaño milimétrico o centimétrico, lo cual en general no es compatible con el uso *in vivo*. P.ej., Johansson, E. *et al.* J. Biomat. Appl. 1993, Vol. 8, páginas 146-173.

El campo de los microsensors es de interés creciente. Así, existe una necesidad general de sensores fiables, baratos, pequeños, precisos, selectivos y/o versátiles, y más en particular de sensores que se puedan usar *in vivo* y/o que permitan medir en tiempo real los cambios en la concentración de un compuesto.

Tal como se ha discutido anteriormente, existe la necesidad especial de un dispositivo para detectar D-aminoácidos, y en particular D-serina, *in vivo* y/o que permita medir en tiempo real su concentración, por ejemplo para desarrollar un método para hallar agentes farmacológicos capaces de interferir con la síntesis, la liberación y/o la eliminación de D-aminoácidos, y de manera más específica de D-serina en el sistema nervioso central (SNC).

En un primer aspecto, la materia de la presente invención es un microelectrodo para medir y/o detectar la concentración de D-serina, y dicho microelectrodo comprende:

- un medio para la oxidación de dicha D-serina, por lo que se genera peróxido de hidrógeno, y dicho medio es una D-aminoácido oxidasa de una levadura o un microorganismo elegido del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (*RgDAAO*), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxisporum* DAAO,
- un medio para optimizar la detección de dicho peróxido de hidrógeno, y dicho medio es un medio para la catálisis de la oxidación del peróxido de hidrógeno, y
- un medio para reducir las interferencias, y dicho medio limita la oxidación de los compuestos distintos del peróxido de hidrógeno.

El microelectrodo de la invención puede tener un límite de detección de 300 nM o menos de D-serina.

El microelectrodo presenta una buena selectividad. Por ejemplo, las disoluciones de serotonina, dopamina, L-serina y glicocola a 10 μ M (concentraciones mucho mayores que las concentraciones fisiológicas de estas moléculas), no generan señales superiores a un 5% de las detectadas a la misma concentración de D-serina.

La Figura 1 muestra un experimento de ejemplo en el que se inyectó peróxido de hidrógeno 200 nM en la cámara de registro. La inyección produce un escalón en la corriente de oxidación en el electrodo de trabajo.

La Figura 2 muestra la calibración del microbiosensor de la invención a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. La respuesta del microelectrodo es lineal con la concentración entre 10 nM y al menos 10 μ M de peróxido de hidrógeno.

“Microelectrodo”, en la presente invención, significa un electrodo de pequeño tamaño, en particular un electrodo que tiene un diámetro medio menor de 1 mm, en especial menor de 500 μm , más en particular menor de 250 μm , en especial menor de 150 μm , y de manera más específica menor de 100 μm , o incluso menor de 50 μm .

5 La D-aminoácido oxidasa (DAAO) puede ser una flavoenzima que contiene una molécula de dinucleótido de flavina-adenina unida de manera covalente o no covalente como cofactor, que es el sitio de la reacción redox.

De manera más precisa, el medio para la oxidación del D-aminoácido puede ser al menos una D-aminoácido oxidasa (DAAO) que no necesita la adición de un cofactor en el medio para oxidar el D-aminoácido. La DAAO
10 puede tener un cofactor natural o artificial que está unido firmemente al resto de apoproteína (es decir, no se produce apoproteína inactiva en las condiciones del ensayo), y/o una actividad específica elevada.

La D-aminoácido oxidasa puede tener una actividad específica elevada, que puede ser de al menos 20, en particular al menos 40, o incluso al menos 55 unidades/mg para al menos un, o solamente un, D-aminoácido específico. De
15 manera más precisa, la D-aminoácido oxidasa puede tener una actividad específica elevada, que puede ser de al menos 20, en particular al menos 40, o incluso al menos 55 unidades/mg para D-serina, y/o al menos 50, en particular al menos 75, o incluso al menos 100 unidades/mg para D-alanina. Una unidad de DAAO se define como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de D-alanina por minuto a 25°C.

20 “Derivados” significa, en la presente invención, una enzima que tiene al menos un 65%, en particular al menos un 75%, más en particular al menos un 85%, de manera notable al menos un 90%, incluso al menos un 95%, aún más en particular al menos un 99% de identidad de aminoácidos con la enzima correspondiente. Los derivados tienen el mismo tipo de actividad, por ejemplo una D-aminoácido oxidasa, en particular con una eficacia del mismo orden, es decir, al menos un 50%, más en especial al menos un 75%, en particular al menos un 100%, incluso más de un 150%
25 de la eficacia de la enzima original. La eficacia de la enzima se puede definir como la proporción k_{cat}/k_m , ensayada con un electrodo de oxígeno a pH 8,5 y 25°C, a una saturación de oxígeno ($[\text{O}_2] = 0,253 \text{ mM}$) [G. Molla, C. Vegezzi, M.S. Pilone, L. Pollegioni, Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, Prot. Express. Purif., 14 (1998) 289-294].

30 La D-serina es un sustrato de la D-aminoácido oxidasa (DAAO). La D-serina puede ser natural o sintética.

El medio para la oxidación del D-aminoácido se puede inmovilizar en el electrodo mediante:

- 35 - Inmovilización covalente, por ejemplo mediante el uso de agentes bifuncionales, tales como glutaraldehído,
 - mediante el uso de vapores del agente bifuncional, o
 - mediante la mezcla preliminar de la disolución de agentes bifuncionales con una mezcla enzimática
- 40 - Retención de la D-aminoácido oxidasa (DAAO), por ejemplo en una matriz reticular, que se puede formar mediante diferentes tipos de reacciones poliméricas, en particular estimuladas mediante UV, irradiación o catalizadores químicos, o que se puede electrogenerar, como polímeros de fenilendiamina, pirrol o anilina,
- 45 - Inmovilización en el cuerpo del electrodo, tal como un electrodo de tipo pasta, por ejemplo una mezcla de enzima, polvo de grafito, mediador, y/o
- Adsorción, en particular en un material laminado con una gran superficie, tal como acetato de celulosa, nailon, geles inorgánicos (por ejemplo gel de sílice) y tales tipos de membranas.

50 El medio para optimizar la detección del compuesto B puede corresponder a un medio para la catálisis de la oxidación de peróxido de hidrógeno.

El medio para optimizar la detección de dicho peróxido de hidrógeno se puede elegir de:

- 55 - un pretratamiento electroquímico del electrodo, en particular un electrodo basado en carbono, y
- deposición, por ejemplo por medio de deposición electroquímica o en vacío, de uno o varios metales, tales como los metales que catalizan la oxidación del peróxido de hidrógeno,
- 60 - deposición de un sistema artificial que cataliza la oxidación del compuesto B, tal como un sistema de peroxidasa artificial, en particular basado en azul de Prusia,
- peroxidasa de rábano (HRP), y
- 65 - uso de nanopartículas, por ejemplo oro, platino, óxidos de silicio, zinc, nanotubos de carbono, etc.

ES 2 339 695 T3

Cuando el medio para optimizar la detección de dicho peróxido de hidrógeno es un metal, se puede elegir del grupo de metales nobles que comprende platino, oro, rutenio, rodio, paladio, iridio, osmio, y de otros metales como hierro, cromo, níquel y tungsteno.

5 El medio para reducir las interferencias puede ser limitar la oxidación de los compuestos distintos del peróxido de hidrógeno, que se pueden oxidar en el electrodo, en particular limitando el acceso y/o el contacto de estos compuestos con el electrodo.

El medio para reducir las interferencias se puede elegir de:

- 10
- membranas poliméricas electrogeneradas, por ejemplo basadas en monómeros como benceno y sus derivados, tales como fenilendiamina, resorcinol, fenol; naftaleno y sus derivados; pirrol y sus derivados; anilina y sus derivados; y las combinaciones de los mismos,
 - 15 - membranas depositadas a partir de disoluciones de polímeros, cargados, como Nafion, o neutros, como poliuretano y poli(cloruro de vinilo), o derivados de celulosa,
 - una capa de moléculas cargadas no poliméricas, por ejemplo tal capa se deposita por medio de una disolución, tal como fosfolípidos y ácidos grasos, como ácido esteárico,
 - 20 - el uso de al menos una enzima que degrada la(s) molécula(s) que interfiere(n), por ejemplo ácido ascórbico oxidasa, en particular esta enzima se puede inmovilizar en el electrodo, y
 - el uso de métodos electroquímicos que permiten distinguir entre moléculas diferentes, por ejemplo amperometría pulsada, voltamperometría cíclica o voltamperometría pulsada.
 - 25

El medio para reducir las interferencias puede ser una capa de un compuesto elegido del grupo que comprende poli-meta-, para- u orto- fenilendiamina (PPD), polímeros basados en naftaleno sustituido, una membrana de rechazo o una membrana polimérica de rechazo.

30 Entre los materiales del electrodo que se pueden usar se pueden citar los siguientes:

- electrodos basados en platino, rodio, paladio, oro, rutenio, posiblemente en forma de aleación, por ejemplo con oro, iridio u otros metales nobles, y entre tales aleaciones un ejemplo es platino al 90% e iridio al 10%,
- 35 - electrodos basados en materiales de carbono, grafito (varillas), carbono vítreo (varillas), fibras de carbono, diamante,
- electrodos cubiertos de nanopartículas de metales nobles, materiales de carbono o una mezcla de los mismos, y
- 40 - electrodos amperométricos basados en compuestos cerámicos.

Se pueden excluir ciertos tipos de materiales para electrodos, ya que conducen posiblemente a la inactivación de la D-aminoácido oxidasa (DAAO), en particular los electrodos de Ag y Hg.

La forma del electrodo puede ser un disco, un anillo, una varilla, un cilindro, un cono o una semiesfera.

En una realización específica, el microelectrodo comprende, o consiste en, una fibra de carbono con la zona de trabajo cubierta por una capa de rutenio, una capa de PPD y una capa de DAAO.

En otro aspecto, la materia de la invención es un dispositivo para detectar y/o medir la concentración de D-serina en un medio, en particular *in vivo*, que comprende un electrodo tal como se definió anteriormente.

55 Este dispositivo puede comprender además una tarjeta de captura de datos que controla un amplificador, en particular equipado con un potenciostato de dos o tres electrodos.

Este dispositivo puede comprender además un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia para el sistema de dos electrodos, y un electrodo auxiliar o contraelectrodo adicional para el sistema de tres electrodos.

60 En otro aspecto, la materia de la invención es un método para detectar y/o medir la concentración de D-serina en un medio, en particular *in vivo*, que comprende las siguientes etapas:

- se coloca un microelectrodo de trabajo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el medio a estudiar,
- 65 - se aplica un potencial de trabajo, en particular mediante voltamperometría cíclica, voltamperometría/amperometría pulsada o aplicando un potencial constante.

ES 2 339 695 T3

El potencial se puede fijar entre -1 y +1 V respecto de Ag/AgCl para la detección de H₂O₂.

Un método de detección eficaz es la amperometría continua a un potencial fijo de +0,55 V respecto de Ag/AgCl. En este caso, la oxidación del peróxido se observa por medio de un escalón de corriente a nivel del electrodo de trabajo (Fig. 1). La relación entre la oxidación y la concentración de peróxido en la disolución es lineal, en particular en un intervalo de 0,01 μ M a 10 μ M (Fig. 2).

En otro aspecto, la materia de la invención es un método para fabricar un microelectrodo que comprende las siguientes etapas:

- tratar el electrodo para incrementar su sensibilidad hacia el peróxido de hidrógeno, en particular por medio de una metalización, por ejemplo una electrodeposición de un metal,
- la deposición de una película polimérica para distinguir el peróxido de hidrógeno de otros compuestos que pueden ser oxidados por el electrodo,
- la deposición de una película de una enzima que oxida D-serina hasta peróxido de hidrógeno en el electrodo, y dicha enzima es una D-serina oxidasa de una levadura o un microorganismo elegido del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (RgDAAO), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxisporum* DAAO, y después la inmovilización de dicha enzima.

La enzima se puede inmovilizar por medio de un proceso de entrecruzamiento, por ejemplo con un aldehído, tal como glutaraldehído, o con otras moléculas tales como polietilenglicol 400 diglicil éter (PEGDGE), o se puede aprisionar en el material del electrodo, tal como la pasta de carbono. También se puede retener o encapsular en una película polimérica, tal como polipirrol.

El metal que cubre la zona de trabajo del electrodo se puede depositar por medio de los métodos clásicos, o mediante un gel impregnado con el metal, tal como el hidrogel de osmio.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de un microelectrodo para medir la concentración de D-serina

1. Preparación del electrodo de fibra de carbono

Se pegó un electrodo de fibra de carbono de 7 μ m de diámetro (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntington, R.U.) a un cable de cobre mediante una deposición con pintura de plata (Radiospares, Beauvais, FR). El cable se coloca en una micropipeta de vidrio en la cual se corta la punta para permitir que sobresalga la fibra de carbono. La unión entre la micropipeta de vidrio y la fibra de carbono se sella con una resina epoxi para asegurar su firmeza, y la fibra de carbono se corta a 150 μ m.

El electrodo se coloca después en etanol durante 20 minutos para limpiar la fibra de impurezas.

2. Electrodeposición de rutenio

La electrodeposición de rutenio se ha llevado a cabo aplicando durante 20 minutos un potencial de -450 mV respecto de Ag/AgCl al electrodo de fibra de carbono que está en una disolución de RuCl₃ a una concentración de 100 μ g/ml y pH 2,5 (disolución patrón de absorción atómica de rutenio, Sigma, Saint Quentin, Francia).

Tras la deposición de rutenio, el electrodo se ha sometido a ciclos 15 veces entre 0 y 700 mV para su estabilización.

3. Deposición de una película de PPD

La deposición se ha realizado de manera electroquímica colocando el electrodo 20 minutos en una disolución 100 mM de m-PD y aplicando un potencial de +700 mV respecto de Ag/AgCl.

4. Deposición de una película de D-aminoácido oxidasa (DAAO)

Se deposita una película de enzima sobre el electrodo sumergiendo el electrodo en una disolución de enzima que comprende 56 mg/ml de RgDAAO, 25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y un 1% de glicerol. El electrodo se extrae de la disolución y después se inmoviliza la enzima mediante la exposición a vapores de una disolución de glutaraldehído al 50%.

ES 2 339 695 T3

De manera alternativa, la enzima se puede inmovilizar mediante el uso de una disolución de enzima que comprende glutaraldehído al 0,17%; glicerol al 2%; 37 mg/ml de RgDAAO; 17 mg/ml de BSA.

El grosor de la película de DAAO obtenida es de alrededor de 15 a 25 μm .

Ejemplo 2

Dispositivo para medir la concentración de D-serina

El sistema de control y adquisición de datos se compone de una tarjeta de adquisición de datos ITC-18 (Instrutech Corporation, Greatneck, NY, EE.UU.), que controla un amplificador VA-10 (NPI Electronics, Tamm, Alemania) equipado con un potencióstato de dos electrodos (electrodo de trabajo que corresponde al microelectrodo de la invención y electrodo de referencia construido a mano compuesto de un cable de plata clorada). La tarjeta de adquisición de datos se controla con el soporte informático SVoltare.

Ejemplo 3

Cultivos celulares

Se prepararon cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas recién nacidas, y se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia (14 días). Los astrocitos se trataron después 5 días con arabinofuranósido de citosina 8 μM para eliminar la microglía restante.

Las células se incubaron 30 minutos en D-serina 500 μM y se lavaron en tampón de Krebs antes del registro. El microelectrodo de la invención se ha colocado en la parte superior de las células sin tocarlas. Para determinar la especificidad de la señal, se colocó un electrodo de control, revestido con albúmina de suero bovino (BSA) en vez de D-aminoácido oxidasa (DAAO), a $\sim 100 \mu\text{m}$ del primero. La estimulación mecánica de un astrocito con una micropipeta de vidrio produjo un incremento de la corriente de oxidación en el electrodo de trabajo, lo que refleja una liberación de D-serina de las células (la corriente en el electrodo de control/BSA no se vio afectada por la estimulación).

Ejemplo 4

Registros in vivo en el SNC de una rata anestesiada

Se anestesiaron ratas Wistar macho que pesaban entre 300 y 400 g con hidrato de cloral, y se colocaron en un aparato estereotáxico. El electrodo de referencia se colocó en la superficie del cráneo y el electrodo de trabajo se insertó en la corteza frontal alrededor de 1 mm bajo la superficie de la piamadre.

Después de un tiempo de estabilización de 30 min, se registró la corriente de oxidación en el electrodo de trabajo con un potencial de 0,5 V respecto de Ag/AgCl.

Después se inyectó D-serina de manera intraperitoneal a una concentración de 1 g/kg de peso corporal.

Después de unos cuantos minutos, la señal mediante este método se incrementó alrededor de 100-200 pA, lo que indica que la D-serina que penetraba a través de la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central fue detectada por el microbiosensor.

REIVINDICACIONES

1. Un microelectrodo para medir y/o detectar la concentración de D-serina, y dicho microelectrodo comprende:

- un medio para la oxidación de dicha D-serina, por lo que se genera peróxido de hidrógeno, y dicho medio es una D-aminoácido oxidasa de una levadura o un microorganismo elegido del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (*RgDAAO*), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxisporum* DAAO,
- un medio para optimizar la detección de dicho peróxido de hidrógeno, y dicho medio es un medio para la catálisis de la oxidación del peróxido de hidrógeno, y
- un medio para reducir las interferencias, y dicho medio limita la oxidación de los compuestos distintos del peróxido de hidrógeno.

2. Un microelectrodo según la reivindicación 1, en el que el medio para la oxidación del D-aminoácido es una D-aminoácido oxidasa (DAAO) que no necesita la adición de un cofactor en el medio para oxidar el D-aminoácido, y/o que muestra una actividad específica elevada.

3. Un microelectrodo según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el medio para la oxidación del D-aminoácido está inmovilizado en el electrodo mediante:

- Inmovilización covalente,
- Retención de la D-aminoácido oxidasa (DAAO),
- Inmovilización en el cuerpo del electrodo, y/o
- Adsorción.

4. Un microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio para optimizar la detección de dicho peróxido de hidrógeno se elige de:

- un pretratamiento electroquímico del electrodo, en particular un electrodo basado en carbono, y
- deposición, por ejemplo por medio de deposición electroquímica o en vacío, de al menos un metal, tal como un metal que cataliza la oxidación del peróxido de hidrógeno,
- deposición de un sistema artificial que cataliza la oxidación del peróxido de hidrógeno, tal como un sistema de peroxidasa artificial, en particular basado en azul de Prusia,
- peroxidasa de rábano (HRP), y
- uso de nanopartículas.

5. Un microelectrodo según la reivindicación 4, en el que el metal se elige del grupo de metales nobles que comprende platino, oro, rutenio, rodio, paladio, iridio, osmio, y de otros metales como hierro, cromo, níquel, tungsteno.

6. Un microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio para reducir las interferencias es limitar la oxidación de los compuestos distintos del peróxido de hidrógeno, que se pueden oxidar en el electrodo, en particular limitando el acceso y/o el contacto de estos compuestos con el electrodo.

7. Un microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio para reducir las interferencias se elige de:

- membranas poliméricas electrogeneradas,
- membranas depositadas a partir de disoluciones de polímeros, cargados o neutros,
- una capa de moléculas cargadas no poliméricas,
- el uso de al menos una enzima que degrada la(s) molécula(s) que interfiere(n), y
- el uso de métodos electroquímicos que permiten distinguir entre moléculas diferentes.

ES 2 339 695 T3

8. Un microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el electrodo se elige del grupo que comprende:

- electrodos basados en platino, rodio, paladio, oro, rutenio,
- electrodos basados en materiales de carbono, grafito y carbono vítreo, fibras de carbono, diamante,
- electrodos cubiertos de nanopartículas basadas en metales nobles, materiales de carbono o una mezcla de los mismos, y
- electrodos amperométricos basados en compuestos cerámicos.

9. Un microelectrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el cual es un electrodo de fibra de carbono cubierto por una capa de rutenio, una capa de PPD y una capa de D-aminoácido oxidasa (DAAO).

10. Un dispositivo para detectar y/o medir la concentración de D-serina en un medio, en particular *in vivo*, que comprende un electrodo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un método para detectar y/o medir la concentración de D-serina en un medio que comprende las siguientes etapas:

- se coloca un microelectrodo de trabajo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el medio a estudiar,
- se aplica un potencial de trabajo, en particular mediante voltamperometría cíclica, voltamperometría/amperometría pulsada o aplicando un potencial constante.

12. Un método para fabricar un microelectrodo que comprende las siguientes etapas:

- tratar el electrodo para incrementar su sensibilidad hacia el peróxido de hidrógeno, en particular por medio de una metalización,
- la deposición de una película polimérica para distinguir el peróxido de hidrógeno de otros compuestos que pueden ser oxidados por el electrodo,
- la deposición de una película de una enzima que oxida D-serina hasta peróxido de hidrógeno en el electrodo, y dicha enzima es una D-serina oxidasa de una levadura o un microorganismo elegido del grupo que comprende *Rhodotorula gracilis* DAAO (RgDAAO), *Trigonopsis variabilis* DAAO, *V. luteoalbum* DAAO, *F. oxisporum* DAAO, y después la inmovilización de dicha enzima.

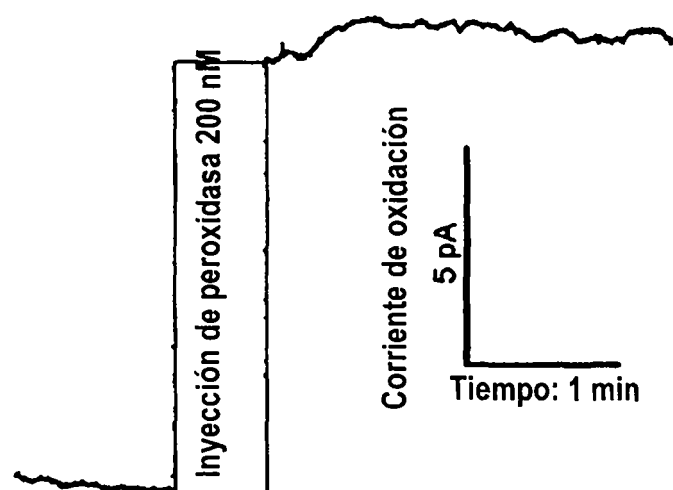


Fig. 1

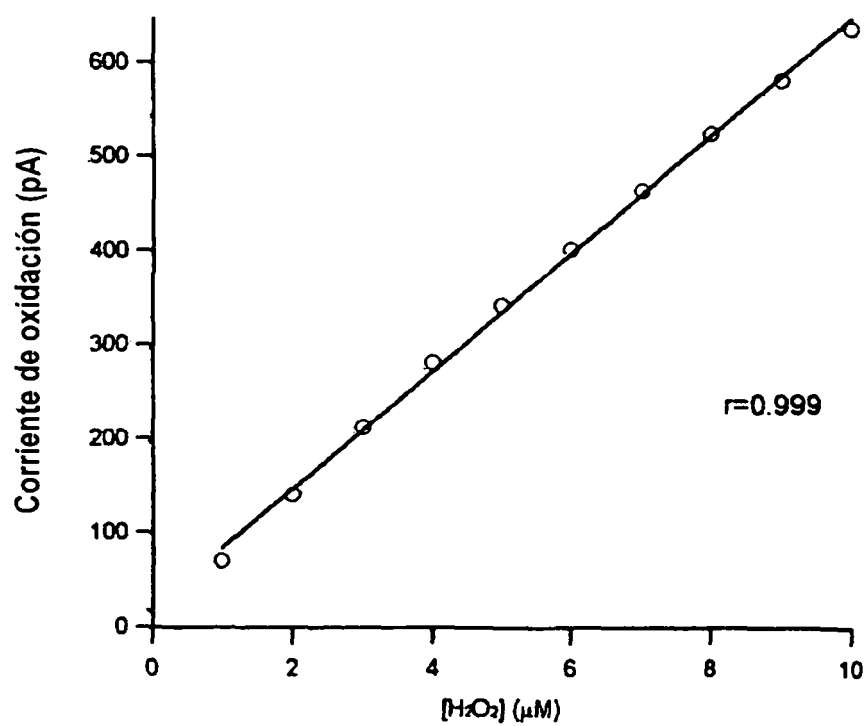


Fig. 2