

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 701**

51 Int. Cl.:

A61B 5/1486 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013** **E 13157968 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2022** **EP 2774538**

54 Título: **Procedimiento para detectar un analito usando un sensor con catalizador de Mn₂O₃**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.09.2022

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KOELKER, KARL-HEINZ y
STAIB, ARNULF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 922 701 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

Procedimiento para detectar un analito usando un sensor con catalizador de Mn_2O_3

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para detectar un analito en una muestra.

10 **Técnica relacionada**

Los sensores y en particular los biosensores se usan en muchos campos técnicos para analizar una muestra para determinar la concentración de un analito presente en la muestra y/o para determinar otros parámetros de la muestra. Los campos técnicos pueden ser análisis de agua, especialmente agua potable, industria alimentaria, fuerzas armadas y medicina, entre otros.

15 Como se usa en el presente documento, el término biosensor en general se refiere a un sensor para detectar al menos un analito en una muestra usando al menos un material de detección biológico. Como ejemplo, el al menos un material de detección biológico puede ser o puede comprender al menos uno de una enzima, un receptor y un anticuerpo para la detección. Adicionalmente, la al menos una reacción de detección puede comprender uno o más componentes adicionales, tales como uno o más de un catalizador, una coenzima, un mediador y un tinte.

20 Por tanto, en general, el sensor y, más preferentemente, el biosensor, pueden comprender al menos un material de detección que se puede adaptar para realizar al menos una reacción de detección con el analito que se va a detectar y/o que se puede adaptar para cambiar al menos una propiedad detectable en presencia del analito, tal como una propiedad eléctrica y/o propiedades físicas tales como un color y/o una reflectancia. En caso de que el sensor sea un biosensor, como se explica anteriormente, el al menos un material de detección comprende preferentemente al menos una enzima, y la reacción de detección preferentemente es o comprende una reacción enzimática. A menudo, el producto de una reacción enzimática de este tipo se convierte para crear un resto detectable. Para esta conversión, a menudo se aplican catalizadores.

30 El uso de óxidos metálicos como catalizadores para biosensores es conocido en la técnica. Los catalizadores aceleran la reacción de conversión de H_2O_2 que se construye por una enzima específica de analito. Por ejemplo, en el documento EP 0 603 154 A2 y WO 2012/130841 A1, el material del electrodo de un biosensor comprende óxido de manganeso (IV) (MnO_2). En este documento se mencionan otros ejemplos de catalizadores: $FeOOH$, Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , Cr_2O_3 y V_2O_5 . SHAN HUANG ET AL: "Glucose Biosensor Using Glucose Oxidase and Electrospun Mn_2O_3 -Ag Nanofibers", ELECTROANALYSIS, vol. 23, n.º 8, 13 de agosto de 2011 (13-08-2011), páginas 1912-1920, describe un sensor de glucosa que comprende un electrodo de carbono vítreo (GCE) modificado que comprende una capa mixta de nanofibras de Mn_2O_3 -Ag y glucosa oxidasa que se superpone al GCE para formar un electrodo de trabajo. La detección de glucosa se basa en la reducción de oxígeno.

40 Los sensores se utilizan con un voltaje de entre 350 y 500 mV. El riesgo de estos intervalos para el voltaje de trabajo es una reacción no deseada de otros componentes en la muestra, tales como otros metabolitos o medicamentos. Los metabolitos que se pueden oxidar en el intervalo de voltaje mencionado de 350 a 500 mV son, entre otros, ácido úrico y ácido ascórbico. Un ejemplo típico de medicamentos que se pueden oxidar en este intervalo de voltaje es el paracetamol. La oxidación de estos componentes en el electrodo da lugar a un incremento indefinido de la señal del electrodo. No existe posibilidad de distinguir la señal resultante de la reacción pertinente de analito del H_2O_2 y la señal de la reacción no deseada de los otros componentes. Por tanto, la señal del sensor es una mezcla de ambas reacciones. Como estas señales no se pueden separar después de la detección, la señal del analito se sobrecarga con la señal que refleja la concentración de los otros componentes. Estas mediciones dan lugar a una detección falsa e imprecisa del analito.

50 El uso de catalizadores que dan lugar a una reducción del analito en un intervalo de voltaje negativo también se menciona en la técnica anterior usando hexacianoferrato. Sin embargo, este procedimiento tampoco da lugar a reacciones cruzadas reducidas, ya que el oxígeno se reduce en el intervalo de voltaje negativo en aproximadamente de -0,1 a -0,2 V. DODEVSKA T ET AL: "Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide on modified graphite electrodes: application to the development of glucose biosensors", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLÍN, DE, vol. 386, n.º 5, 12 de septiembre de 2006 (12-09-2006), páginas 1413-1418, proporciona procedimientos de funcionamiento de sensores de glucosa enzimáticos en modo de reducción de H_2O_2 .

60 Existe una necesidad de sensores aplicables en sistemas biológicos tales como el cuerpo de un paciente para detectar analitos tales como glucosa u otros metabolitos de una manera precisa y reproducible. Hasta el momento, son conocidos muchos sensores que muestran una alta reactividad cruzada con muchos metabolitos o moléculas que a menudo están presentes en un cuerpo vivo.

65

Problema que se va a resolver

Por tanto, un objetivo de la presente invención es reducir o incluso superar al menos una de las desventajas del estado de la técnica.

5 En particular, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar un analito que produzca resultados precisos y reproducibles.

10 Adicionalmente, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar un analito que muestra una alta especificidad hacia el analito y poca reactividad cruzada con otros ingredientes de la muestra además del analito.

15 Además, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar un analito que tiene una alta sensibilidad en un amplio intervalo de concentración del analito.

Sumario de la invención

20 Una contribución a la solución de al menos uno de los objetivos anteriores se proporciona por la materia objeto de la reivindicación independiente formadora de categorías.

25 Como se usa en lo que sigue, los términos "tener", "comprender" o "incluir" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de manera no excluyente. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, además del rasgo característico introducido por estos términos, no están presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que están presentes uno o más de otros rasgos característicos. Como ejemplo, las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" se pueden referir tanto a una situación en la que, además de B, ningún otro elemento está presente en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) como a una situación en la que, además de B, uno o más de otros elementos están presentes en la entidad A, tales como elemento C, elementos C y D o incluso otros elementos.

30 La invención se expone en la reivindicación 1 adjunta dirigida a un procedimiento para detectar un analito en una muestra.

35 Proporcionar el sensor se puede lograr por cualquier medio que el experto en la técnica seleccione para proporcionar un sensor en un procedimiento para detectar un analito en una muestra. Proporcionar puede ser cualquier medio para proporcionar al menos una parte del sensor para que se ponga en contacto con una muestra o un componente que comprende el analito, tal como un cuerpo, especialmente un tejido de un cuerpo. Los ejemplos de proporcionar el sensor son colocar el sensor sobre un sustrato, poner el sensor en contacto con una muestra, insertar o implantar el sensor en un cuerpo y fijar el sensor a un cuerpo que comprende la muestra.

40 Colocar el sensor sobre un sustrato se puede lograr colocando el sensor sobre un sustrato tal como un escritorio, una lámina o cualquier otro sustrato de tal manera que al menos el electrodo de trabajo se puede poner en contacto con una muestra. La colocación del sensor también se puede lograr fijando al menos una parte del sensor a un componente, tal como una máquina, con el objetivo de poner en contacto al menos el electrodo de trabajo con el analito o la muestra.

45 Preferentemente, poner en contacto el sensor con una muestra se logra poniendo en contacto al menos una parte del sensor, especialmente el electrodo de trabajo, con la muestra. Para un sensor *in vitro*, el contacto se puede lograr sumergiendo el sensor al menos parcialmente en un fluido de muestra. De forma alternativa, la muestra se puede aplicar al sensor, especialmente al electrodo de trabajo, por medio de un medio de aplicación. Los medios de aplicación se pueden seleccionar del grupo que consiste en una pipeta, una impresora, una esponja o una combinación de al menos dos de los mismos. Para un sensor *in vivo*, el contacto se puede lograr poniendo en contacto al menos el electrodo de trabajo del sensor con un cuerpo vivo, por ejemplo, el tejido de un cuerpo humano.

55 La inserción o implantación del sensor en un cuerpo se logra preferentemente usando un dispositivo de inserción. El dispositivo de inserción se puede disponer para entrar en el cuerpo de un cuerpo vivo. El dispositivo de inserción preferentemente proporciona una punta para introducirse en el cuerpo de un cuerpo vivo. De forma alternativa, el propio sensor puede proporcionar una punta en un extremo para introducir el sensor en el tejido de un cuerpo vivo.

60 La fijación del sensor a un cuerpo se puede lograr fijando el sensor a un tejido de un cuerpo vivo. El tejido puede estar en el interior o en el exterior del cuerpo vivo. El tejido se puede seleccionar del grupo que consiste en piel o mucosa. La piel puede estar situada en cualquier parte del cuerpo del usuario. La mucosa puede estar situada preferentemente en el interior de la nariz, en el interior de la boca o en el interior del oído.

65 A continuación, se proporcionarán dimensiones, materiales y otros rasgos característicos opcionales relacionados

con el sensor, donde el sensor se describe y define con más detalle. Todas las dimensiones, materiales, geometrías y relaciones con respecto a otros componentes descritos para el sensor y el sistema de sensores a continuación también son aplicables al procedimiento.

5 La aplicación de un voltaje al electrodo de trabajo se puede lograr utilizando un dispositivo que pueda generar un voltaje entre el electrodo de trabajo y otro electrodo tal como un contraelectrodo o un electrodo de referencia o ambos. En general, se utiliza una fuente de alimentación que suministra voltaje continuo. El dispositivo se puede seleccionar del grupo que consiste en un potencióstato, una batería, un acumulador y una fuente de alimentación o una combinación de al menos dos de los mismos. Preferentemente, se utiliza un potencióstato para suministrar el
10 voltaje al electrodo de trabajo. Para realizar la aplicación de un voltaje al electrodo de trabajo, la fuente de alimentación se puede conectar a los cables de contacto del sensor, que se describen en detalle a continuación para el sensor. El voltaje aplicado al electrodo de trabajo se puede regular por un regulador de voltaje. Al ponerse en contacto el electrodo de trabajo, al que se aplica un voltaje, con la muestra, las moléculas de H_2O_2 de la muestra reaccionarán con el electrodo de trabajo. La reacción de las moléculas de H_2O_2 en el electrodo de trabajo provoca
15 un flujo de corriente en el sensor que se puede medir por un dispositivo de detección. La corriente medida es preferentemente proporcional a la cantidad de H_2O_2 en la muestra. En al menos un intervalo de voltaje específico, la velocidad de reacción de las moléculas de H_2O_2 en el electrodo de trabajo depende directamente de la tasa de difusión de las moléculas de H_2O_2 en la muestra. Eso da lugar a la medición controlada por difusión de las moléculas de H_2O_2 y a una corriente específica medida para una concentración de H_2O_2 específica, también
20 denominada corriente umbral de difusión. Por tanto, la señal de corriente medida se altera proporcionalmente a un cambio de concentración de H_2O_2 en este intervalo de voltaje controlado por difusión. Un incremento o una disminución del voltaje aplicado al electrodo de trabajo no alterará la velocidad de reacción de las moléculas de H_2O_2 en este intervalo de voltaje controlado por difusión específico.

25 El voltaje del electrodo de trabajo está en un intervalo de 50 a 150 mV si se compara con un electrodo de referencia que comprende Ag/AgCl con KCl 3 M. El contraelectrodo, el electrodo de referencia o ambos pueden comprender grafito. El electrodo de referencia o el contraelectrodo puede tener un tamaño en un intervalo de 0,1 a 10 mm², o en un intervalo de desde 0,5 a 5 mm², o en un intervalo de 1 a 2 mm². El contraelectrodo puede tener un tamaño, donde no sea necesario un electrodo de referencia adicional. Por ejemplo, el contraelectrodo tiene un tamaño para
30 el que el potencial no cambia más de 10 mV durante una operación del sensor midiendo corrientes. Preferentemente, el sensor mide corrientes en un intervalo de -100 nA a 100 nA, o en un intervalo de -50 nA a 50 nA, o en un intervalo de -20 nA a 20 nA.

35 Como se usa en el presente documentos, un sensor es un dispositivo que puede detectar al menos un analito en una muestra. Para este propósito, el sensor se puede adaptar para generar una señal detectable y/o para cambiar al menos una propiedad detectable cuando entra en contacto con el analito. Como se usa en el presente documento, un analito es un compuesto específico o una combinación de compuestos que se van a detectar. La señal detectable se correlaciona con la concentración del analito de manera reproducible.

40 El sensor es un sensor electroquímico para detectar el al menos un analito. Como se usa en el presente documento, el término sensor electroquímico en general se refiere a un sensor que tiene al menos dos electrodos sensores y que se adapta para detectar la concentración del al menos un analito en base a al menos una medición de una corriente. Los al menos dos electrodos sensores comprenden al menos un electrodo de trabajo, con un potencial eléctrico que varía de acuerdo con la concentración de los analitos que se van a detectar, y además al
45 menos otro elemento, tal como al menos un electrodo de referencia y/o al menos un contraelectrodo. El electrodo de trabajo comprende una pluralidad de materiales de detección. El material de detección puede ser parte del primer material de electrodo, puede formar el primer material de electrodo o el primer material de electrodo puede ser parte del material de detección. Se mide una corriente y se usa como medida de la concentración del analito.

50 El sensor puede tener cualquier conformación que el experto en la técnica considere adecuada para su uso en el contexto de la presente invención. Como ejemplo, el sensor puede ser o puede comprender uno de un sensor en forma de tira, un disco sensor, una cinta sensora, una barra sensora y una aguja sensora. El sensor puede comprender uno o más campos de prueba, en el que cada campo de prueba comprende los materiales de
55 detección.

El sensor comprende un sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato que el experto en la técnica considere adecuado para su uso en el contexto de la presente invención. El sustrato es una de las partes de construcción de forma del sensor, por lo que, si no se especifica de forma diferente, las especificaciones para la conformación y las dimensiones de los sensores también se aplican al sustrato. El sustrato y, preferentemente también el sensor,
60 pueden tener una conformación al menos en dos dimensiones, seleccionadas del grupo que consiste en redonda, ovalada, angular o una mezcla de al menos dos de las mismas. El sustrato o el sensor puede además tener una conformación seleccionada del grupo que consiste en una placa, una tira, una cinta, un cubo, un paralelepípedo, un cono, una bola, una pirámide, un disco, una aguja o una mezcla de al menos dos de los mismos. En un modo de realización preferente del sustrato o del sensor, el sustrato o el sensor tiene conformación de aguja o de barra.

65 Las dimensiones del sensor pueden ser cualquiera que el experto en la técnica considere adecuadas para un

sensor para la detección de un analito. El sensor puede tener, por ejemplo, una longitud en el intervalo de desde 0,1 a 30 cm, o en el intervalo de desde 1 a 20 cm, o en el intervalo de desde 2 a 10 cm. El ancho del sensor puede estar en un intervalo de desde 0,1 a 50 mm, o en un intervalo de desde 0,5 a 20 mm, o en un intervalo de desde 1 a 10 mm. La altura del sensor puede estar en un intervalo de desde 0,01 a 100 mm, o en un intervalo de desde 0,05 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,1 a 5 mm. Como el sustrato es una parte de construcción de forma principal del sensor, las dimensiones mencionadas para el sensor también se aplican a las dimensiones del sustrato.

El sustrato puede comprender al menos un material que posibilita superponer al sustrato al menos otro material. El sustrato puede ser un sólido. El sustrato puede ser flexible o rígido. Preferentemente, el sustrato es flexible, lo que significa que el sustrato se puede deformar manualmente en al menos una dirección, tal como por fuerzas de menos de 10 N. El material del sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en un vidrio, un polímero, una cerámica, un papel, un óxido de metal y un metal o una combinación de al menos dos de los mismos. Como ejemplo de un sustrato de múltiples componentes, el sustrato puede ser o puede comprender una configuración de múltiples capas que tiene dos o más capas, tal como un laminado. En un modo de realización del sensor, el material del sustrato comprende un polímero. El polímero se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un polietileno, un polipropileno, un poliestireno, un poliéster y una poliimida o una combinación de al menos dos de los mismos. El polímero puede tener un peso molecular en un intervalo de desde 1 000 a 1 000 000 g/mol, o en un intervalo de desde 5 000 a 500 000 g/mol, o en un intervalo de desde 10 000 a 100 000 g/mol. Preferentemente, el polímero se selecciona del grupo de una poliimida, por ejemplo, polibismaleimida (PBMI), polibencimidazol (PBI), polioxadiazobencimidazol (PBO), poliimidiasulfona (PISO) y polimetacrilimida (PMI), o una mezcla de al menos dos de los mismos. El sustrato puede comprender un polímero en un intervalo de un 10 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 20 a un 95 % en peso, o en un intervalo de desde un 30 a un 90 % en peso. Los componentes mencionados del sustrato pueden sumar hasta un 100 % en peso.

El sustrato puede tener cualquier forma o geometría que sea adecuada para su uso en un sensor. El sustrato tiene preferentemente la forma o geometría como se describe anteriormente para el sensor. El espesor o diámetro del sustrato se puede encontrar en un intervalo de desde 0,1 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,5 a 5 mm, o preferentemente en un intervalo de desde 1 a 3 mm. En el caso de una extensión cúbica o paralelepípedica del sustrato, el sustrato puede tener una extensión horizontal, definida como el producto del ancho por el largo, en un intervalo de desde 1 mm² a 100 cm², o en un intervalo de desde 10 mm² a 50 cm², o en un intervalo de desde 50 mm² a 10 cm². Además de una conformación simétrica, el sensor o el sustrato pueden tener una forma asimétrica. Por ejemplo, el sustrato puede tener forma de L. Las extensiones de la parte más larga de la L pueden estar en los intervalos para el sustrato rectangular como se describe anteriormente.

El sustrato comprende una superficie de sensor. La superficie de sensor se puede definir como la parte de la superficie del sustrato a la que se superpondrá el material conductor o el material de electrodo. Como se explica anteriormente, el material de electrodo puede formar un material de detección y/o puede ser parte de un material de detección. En el mismo, el material conductor y/o el material de electrodo pueden estar en contacto directo con el sustrato. De forma alternativa, se puede interponer al menos una capa intermedia entre el material conductor y/o el material de electrodo, tal como una capa aislante y/o una barrera de difusión.

La superficie de sensor puede tener un área que se encuentre en un intervalo de desde un 5 a un 90 %, o en un intervalo de desde un 10 a un 80 %, o en un intervalo de desde un 20 a un 70 % del área superficial total del sustrato. La superficie de sensor del sensor se puede proporcionar en cualquier lado o superficie del sustrato. La superficie de sensor puede tener cualquier extensión del sustrato que sea accesible o contactable, al menos durante el procedimiento de producción, desde el exterior del sensor o sustrato. Cualquier superficie accesible o contactable del sustrato también se puede denominar superficie exterior. La extensión de al menos una superficie del sensor puede ser uniforme o consecuyente en su conformación. La extensión de una superficie puede ser uniforme, inclinada o curva. El lado o la superficie en la que se proporciona la superficie de sensor sobre el sustrato puede estar situado en el exterior del sustrato del sensor. La superficie de sensor puede ser la totalidad o al menos una parte de la superficie exterior del sustrato. La superficie de sensor puede tener cualquier conformación que proporcione la al menos una superficie del sustrato. La conformación de la superficie de sensor se puede seleccionar del grupo que consiste en uniforme, inclinada, angular y curva o una mezcla de al menos dos de las mismas.

El sustrato puede tener una extensión paralelepípedica, en el que se puede proporcionar la superficie de sensor en al menos uno de los lados más anchos del sustrato. La superficie de sensor también se puede proporcionar en uno de los lados más pequeños del paralelepípedo. Además, la superficie de sensor se puede proporcionar en más de una superficie del sustrato. La superficie de sensor se puede extender en dos o más superficies del sustrato. La superficie de sensor puede tener una extensión en un intervalo de desde 0,05 a 50 cm², o en un intervalo de desde 0,1 a 20 cm², o en un intervalo de desde 0,2 a 10 cm².

El material conductor se superpone al menos a una parte de la superficie de sensor.

El material conductor puede comprender cualquier material que puede conducir una corriente eléctrica. El material conductor puede comprender al menos un material conductor seleccionado del grupo que consiste en un metal, un

semimetal, un polímero conductor y un material inorgánico conductor o una mezcla de al menos dos de los mismos.

El metal se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en oro, plata, platino, wolframio y paladio o una mezcla de al menos dos de los mismos. Preferentemente, el material conductor comprende oro.

5 El semimetal se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en silicio, boro, alfa estaño o una mezcla de al menos dos de los mismos.

10 El polímero conductor puede comprender preferentemente un polímero seleccionado del grupo que consiste en un politiofeno, un polipirrol, una polianilina, un poliacetileno, un poliisotiofeno y un poli-p-fenileno y derivados y mezclas o copolímeros de al menos dos de los mismos. Los ejemplos de polímeros conductores son poli(p-fenilvinileno), poli(sulfuro de p-fenileno), poli(3,4-etilendioxitiofeno) o mezclas de al menos dos de los mismos.

15 El material inorgánico se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en un material cerámico eléctricamente conductor, un grafeno, grafito o una mezcla de los mismos.

20 El material inorgánico conductor puede ser preferentemente un material cerámico eléctricamente conductor, también denominado cermet, que comprende un material cerámico y uno metálico. El material cerámico puede comprender preferentemente uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, carbono, boro, nitrógeno, silicio o una mezcla de al menos dos de los mismos. El material cerámico se puede seleccionar del grupo que consiste en óxido de aluminio, en particular Al_2O_3 ; óxido de circonio, en particular ZrO_2 ; óxido de manganeso, en particular MgO ; óxido de aluminio templado con circonio (ZTA); nitruro de aluminio; titanato de aluminio; una piezocerámica seleccionada del grupo que consiste en $\text{Ba}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$, $\text{Ba}(\text{Ce}, \text{Ti})\text{O}_3$, niobato de sodio y potasio (PSN), PSN-LiSbO_3 y PSN-LiTaO_3 o una mezcla de al menos dos de los mismos. El material metálico del material inorgánico conductor puede comprender preferentemente un metal seleccionado del grupo que consiste en níquel, molibdeno, una aleación de molibdeno, iridio, tantalio, una aleación de tantalio, cobalto, una aleación de cobalto-cromo, titanio, una aleación de titanio, niobio, una aleación de niobio, platino, una aleación de platino, wolframio, una aleación de wolframio, acero o una mezcla de al menos dos de los mismos. La cerámica eléctricamente conductora se puede seleccionar del grupo que consiste en siliciuro de wolframio (WSi_2), carburo de wolframio (WC), nitruro de titanio (TiN), carbonitruro de titanio (TiCN), carburo de titanio (TiC).

25 El material conductor puede comprender el material conductor en un intervalo de desde un 10 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 20 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 30 a un 95 % en peso en base al peso total del material conductor. Preferentemente, el material conductor comprende oro en un intervalo de desde un 50 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 70 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 80 a un 100 % en peso.

30 El material conductor se superpone al menos a una parte de la superficie de sensor del sustrato. El material conductor se puede superponer a la superficie de sensor en un intervalo de desde un 5 a un 100 %, o en un intervalo de desde un 10 a un 95 %, o en un intervalo de desde un 20 a un 90 % por área. El material conductor se puede superponer a un área de la superficie del sustrato en un intervalo de desde $0,01 \text{ mm}^2$ a 50 cm^2 , o en un intervalo de desde $0,1 \text{ mm}^2$ a 40 cm^2 , o en un intervalo de desde $0,5 \text{ mm}^2$ a 10 cm^2 .

35 La superposición de la superficie de sensor por el material conductor se puede lograr por todos los procedimientos que el experto en la técnica elija para este propósito. La superposición se puede lograr, por ejemplo, por una o más técnicas de depósito, tal como una o más técnicas de depósito seleccionadas del grupo que consiste en impresión, recubrimiento por rotación, dosificación, raspado, pulverización, goteo, laminado, recubrimiento, impregnación o inmersión o una combinación de al menos dos de los mismos. La impresión se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en impresión *offset*, impresión por huecograbado, impresión por chorro de tinta, serigrafía, impresión con estencil, tampografía, impresión flexográfica o una combinación de las mismas. El recubrimiento se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en un depósito químico con vapor, un depósito físico con vapor, un recubrimiento químico y electroquímico, una pulverización, un recubrimiento óptico o una combinación de al menos dos de los mismos. El depósito físico con vapor se puede seleccionar del grupo que consiste en depósito de arco catódico, depósito físico con vapor por haz de electrones (EBPVD), revestimiento iónico, depósito asistido por haz de iones (IBAD), pulverización catódica con magnetron, depósito por láser pulsado, depósito por pulverización catódica, depósito a vacío, depósito por evaporación como evaporación a vacío o una combinación de al menos dos de los mismos. Preferentemente, la superposición se realiza por un procedimiento de pulverización catódica de oro sobre el sustrato. Superponiendo a al menos una parte de la superficie de sensor el material conductor, se pueden lograr uno o más cables de contacto conductores. Preferentemente, se proporciona más de un cable de contacto conductor en la superficie de sensor. Preferentemente, se aplican tres cables de contacto conductores a la superficie de sensor por el procedimiento de superposición. Los cables de contacto conductores pueden estar separados entre sí por un ancho en un intervalo de desde $0,1$ a 10 mm , o en un intervalo de desde $0,3$ a 5 mm , o en un intervalo de desde $0,5$ a 2 mm . Cada cable de contacto puede construir la base para un electrodo. Como se explica anteriormente, el sensor puede comprender preferentemente al menos dos electrodos, en el que se proporciona al menos un electrodo de trabajo,

5 teniendo el electrodo de trabajo el material conductor y el primer material de electrodo. Adicionalmente, como se explica anteriormente, se pueden proporcionar uno o más electrodos adicionales, tales como uno o más electrodos de referencia y/o uno o más contraelectrodos. El uno o más electrodos adicionales pueden comprender cada uno al menos un material conductor y/o al menos un cable de contacto y, adicional u opcionalmente, al menos otro material de electrodo, tal como al menos un material de referencia. Adicionalmente, el al menos un electrodo de trabajo y, opcionalmente, el al menos otro electrodo, pueden estar total o parcialmente cubiertos por al menos una capa protectora, tal como una membrana, que es permeable para el analito que se va a detectar y/o para al menos un electrolito de la muestra, mientras que el primer material de electrodo se puede retener y se puede evitar que se ponga en contacto con la muestra y/o un tejido corporal circundante. De este modo, se puede proporcionar una biocompatibilidad del sensor. Como ejemplo, se puede hacer referencia al documento WO 2007/071562 A1.

10 El primer material de electrodo forma un electrodo de trabajo o al menos parte de un electrodo de trabajo.

15 Además del material de detección, el primer material de electrodo puede comprender al menos un material que puede conducir una corriente eléctrica. El material que puede conducir una corriente eléctrica se denomina material conductor. El material conductor se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en un metal, un semimetal, un polímero conductor o una mezcla de al menos dos de los mismos.

20 El metal se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en oro, plata, platino, volframio, paladio o una mezcla de al menos dos de los mismos.

El semimetal se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en silicio, boro, alfa estaño o una mezcla de al menos dos de los mismos.

25 El polímero conductor puede comprender preferentemente un polímero seleccionado del grupo que consiste en un politiofeno, un polipirrol, una polianilina, un poliacetileno, un poliisotonaftaleno y un poli-p-fenileno y derivados y mezclas o copolímeros de al menos dos de los mismos. Los ejemplos de polímeros conductores son poli(p-fenilenvinileno), poli(sulfuro de p-fenileno), poli(3,4-etilendioxitiofeno).

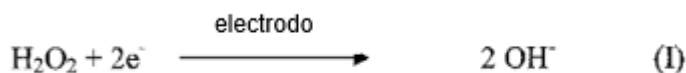
30 El material inorgánico se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en un material cerámico eléctricamente conductor, un grafeno, grafito o una mezcla de los mismos. Preferentemente, el material conductor comprende grafito.

35 El analito puede ser cualquier compuesto o elemento que se va a detectar que sea de interés. El analito puede ser parte de una muestra. La muestra normalmente es un fluido o líquido o una mezcla de los mismos. En el campo médico, por ejemplo, el analito puede ser un compuesto en una muestra como un tejido o un líquido corporal de un paciente. El líquido corporal se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, líquido intersticial, orina, saliva, sudor o una combinación de al menos dos de los mismos. El analito se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en glucosa, lactosa, lactato, ácido úrico, urea, colesterol, triglicéridos y cualquier otro compuesto en un líquido corporal de un paciente o una combinación de al menos dos de los mismos. En lo que sigue, sin pretender restringir el alcance de la invención, se hará referencia principalmente a la detección electroquímica de glucosa en sangre y/o líquido intersticial.

45 La muestra se puede aplicar al menos al electrodo de trabajo del sensor *in vitro* o bien *in vivo*. La muestra para el análisis *in vitro* puede tener un volumen en un intervalo de 0,001 a 10 ml, o en un intervalo de 0,01 a 5 ml, o en un intervalo de desde 0,05 a 1 ml. La muestra para el análisis *in vitro* se puede aplicar por cualquier medio adecuado para este propósito. La aplicación de la muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en pipeteo, inmersión, dosificación y una mezcla de al menos dos de los mismos. Para el análisis *in vivo*, al menos el electrodo de trabajo se puede poner en contacto con un líquido corporal de un paciente.

50 Por tanto, preferentemente, el sensor puede ser un sensor implantable que al menos parcialmente es implantable en un tejido corporal de un usuario. El contacto puede ser una fijación, por ejemplo, por adhesión, o un contacto del sensor al menos con el electrodo de trabajo a una región del cuerpo donde el electrodo de trabajo puede entrar en contacto con un líquido corporal, tal como sudor o saliva. Preferentemente, el sensor se introduce debajo de la piel en el líquido intersticial. Por lo tanto, el sensor preferentemente es biocompatible.

60 Además, el primer material de electrodo comprende partículas de Mn₂O₃. Las partículas de Mn₂O₃ pueden catalizar al menos una parte de la reacción de detección del analito o un producto del analito en una primera reacción de detección con el material de detección. Por ejemplo, una parte de la reacción de detección puede ser una reacción de electrólisis, lograda de acuerdo con la ecuación (I):



La reacción de reducción de H_2O_2 mostrada en la ecuación (I) se cataliza por las partículas de Mn_2O_3 . Se ha descubierto que usando partículas de Mn_2O_3 la reacción de reducción de H_2O_2 se puede lograr en un intervalo de voltaje, donde no se produce una reducción de O_2 . Por tanto, la señal resultante no se falsea por una reacción de oxígeno en cualquiera de los electrodos. La reacción de detección, en forma de reducción de H_2O_2 , se puede lograr en el electrodo de trabajo si se aplica un voltaje suficiente entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia y/o contraelectrodo. Este voltaje también se denomina voltaje de descomposición. Para un sensor electroquímico, también denominado sensor electrolítico, el voltaje de descomposición de la ecuación (I) debe ser diferente del voltaje de descomposición de la reacción del oxígeno (O_2), en forma de reducción, en el electrodo de trabajo. El voltaje de descomposición de un componente en el electrodo de trabajo puede depender, entre otras cosas, del material que comprende el electrodo de trabajo. Añadiendo partículas de Mn_2O_3 al primer material de electrodo, el voltaje de descomposición del H_2O_2 se puede cambiar a un intervalo de potencial positivo. El voltaje aplicado al electrodo de trabajo se puede seleccionar en un intervalo de desde 0,025 a 0,175 V, o en un intervalo de desde 0,050 a 0,150 V, o en un intervalo de desde 0,100 a 0,130 V si se compara con un electrodo de referencia que comprende Ag/AgCl con KCl 3 M. Un efecto positivo de elegir este intervalo de voltaje es el hecho de que la reacción del H_2O_2 en el electrodo de trabajo es específica. Eso significa que, preferentemente, casi ningún otro componente de la muestra se oxida o reduce en el electrodo de trabajo. Cambiando el voltaje de descomposición a voltajes más bajos, también se pueden reducir otros reactivos en el electrodo de trabajo, tales como el oxígeno, como se mencionó anteriormente.

El primer material de electrodo que se superpone al menos a una parte del material conductor también puede significar que a una parte del sustrato también se le superpone el primer material de electrodo. La superposición de al menos una parte del material conductor por el primer material de electrodo se puede lograr por impresión, estratificación, recubrimiento, impregnación o inmersión o una combinación de los mismos, preferentemente por impresión. Al menos la impresión es una forma de superposición de al menos una parte de una superficie, en la que el primer material de electrodo se aplica como una fase líquida y/o como otra forma de un material deformable, tal como una pasta. Por impresión, la fase líquida y/o la pasta se aplican por medio de un adyuvante sobre la superficie de sensor del sustrato. Esto se puede lograr por diferentes formas de adyuvantes. La fase líquida y/o la pasta se pueden aplicar, por ejemplo, por medio de una boquilla o válvula por extrusión o pulverización. De forma alternativa o adicionalmente, la fase líquida y/o la pasta se pueden aplicar o imprimir por medio de un rodillo o un tambor. Como procedimientos de impresión, son bien conocidos la impresión por huecograbado por medio de un rodillo o la impresión por chorro de tinta a través de una abertura, por ejemplo, una boquilla o válvula, así como la serigrafía a través de una malla y un recubrimiento por rotación. Durante el procedimiento de superposición, se puede aplicar presión a la fase líquida y/o la pasta o al sustrato. De forma alternativa, la fase líquida y/o la pasta se aplican usando únicamente la gravedad.

La boquilla o válvula puede funcionar por un elemento piezoeléctrico o una válvula neumática, ya que a menudo se usan para impresoras de chorro de tinta. Estas válvulas tienen la propiedad de construir porciones de la fase líquida y/o la pasta aplicada que se podrían aplicar preferentemente bajo presión a la superficie. Las porciones de la fase líquida y/o la pasta tienen preferentemente un volumen en un intervalo de desde 0,1 a 500 nl, o preferentemente en un intervalo de desde 1 a 100 nl, o preferentemente en un intervalo de desde 10 a 50 nl.

En el procedimiento de impresión por huecograbado, la superficie que se va a superponer se alimenta entre dos rodillos que están en contacto entre sí. Un rodillo se denomina rodillo de impresión y el otro rodillo se denomina rodillo de huecograbado porque la fase líquida y/o la pasta entran en contacto con él. Guiando el sustrato entre los rodillos en contacto con la superficie de sensor orientada hacia el rodillo de huecograbado, la fase líquida y/o la pasta se puede transferir a la superficie de sensor del sustrato.

En el procedimiento de serigrafía, típicamente, se fuerza una pasta a través de una malla sobre la superficie del sustrato. Esto se puede lograr únicamente por gravedad o de forma alternativa o adicional usando una espátula limpiacrystal o un bisturí. Los procedimientos de superposición descritos se pueden repetir varias veces para superponer más de una parte de la superficie de sensor.

La fase líquida o la pasta puede comprender cualquier materia líquida o sólida que el experto en la técnica usaría para portar el primer material de electrodo. Preferentemente, la fase líquida comprende un líquido que puede disolver al menos una parte del primer material de electrodo. La fase líquida o la pasta comprende preferentemente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto orgánico y un compuesto inorgánico, preferentemente agua; o mezclas de los mismos. En el caso de que la fase líquida y/o la pasta comprenda un compuesto orgánico, el compuesto orgánico se puede seleccionar del grupo que consiste en un alcohol, una amina, un éster, un éter, un hidrocarburo, un sulfóxido, una sulfona, un sulfonato, una lactona, una lactama, un nitrocompuesto, un nitrilo y un aceite o una combinación de al menos dos de los mismos. Además, la fase líquida y/o la pasta pueden comprender un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en un alcohol alifático, un alcohol aromático, un alcohol alqueno cíclico, un éter glicólico, un hidrocarburo alifático, un hidrocarburo aromático, un hidrocarburo ramificado, un benceno, un hidrocarburo halogenado, un acetato de éter glicólico o una combinación de al menos dos de los mismos. El compuesto orgánico de la fase líquida y/o la pasta se selecciona preferentemente del grupo que consiste en metanol, etanol, butanol, propanol, acetona, γ -butirolactona, N-metil-2-pirrolidona, acetonitrilo, nitrometano, trietilamina, dimetilformamida, heptano, hexano,

5 dimetilsulfóxido, sulfolano, carbonato de etileno, éter monobutílico de etilenglicol, carbonato de dimetilo, acetato de éter metílico de propilenglicol, acetato de éter metílico de propilenglicol o una mezcla de al menos dos de los mismos. La fase líquida y/o la pasta puede comprender un compuesto orgánico en un intervalo de desde un 0,1 a un 99 % en peso, o preferentemente en un intervalo de desde un 1 a un 95 % en peso, o preferentemente en un intervalo de desde un 10 a un 90 % en peso, o preferentemente en un intervalo de desde un 20 a un 80 % en peso, cada uno en base al peso total de la fase líquida y/o la pasta.

10 La fase líquida y/o la pasta en general puede comprender uno o más disolventes y/o aglutinantes. En la misma, se pueden usar disolventes inorgánicos y/u orgánicos.

15 En el caso donde la fase líquida y/o la pasta comprenda un compuesto inorgánico, el compuesto inorgánico se puede seleccionar del grupo que consiste en agua, un ácido y una base, especialmente ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y sosa cáustica alcalina o mezclas de los mismos. La fase líquida y/o la pasta puede comprender un compuesto inorgánico en un intervalo de desde un 0,1 a un 99 % en peso, o en un intervalo de desde un 1 a un 95 % en peso, o en un intervalo de desde un 10 a un 90 % en peso, cada uno en base al peso de la fase líquida y/o la pasta. Los componentes mencionados para la fase líquida y/o la pasta suman un 100 % en peso.

20 La fase líquida y/o la pasta puede tener una viscosidad en un intervalo de desde 100 a 50000 mPa*s, o en un intervalo de desde 500 a 10000 mPa*s, o en un intervalo de desde 1000 a 5000 mPa*s.

25 Después de superponer a la superficie de sensor la fase líquida y/o la pasta, que comprende al menos el primer material de electrodo, la fase líquida y/o la pasta se seca para formar el electrodo de trabajo. El secado se puede establecer por cualquier procedimiento que sea adecuado para el propósito de la invención. El secado se puede respaldar por diferentes procedimientos de secado. Los procedimientos de secado se pueden seleccionar del grupo que consiste en calentamiento, soplado, irradiación o una combinación de al menos dos de los mismos. El calentamiento se puede lograr por la provisión de un horno de calentamiento o por el suministro de una superficie calentada o por una combinación de los mismos. El soplado se puede lograr por el suministro de un flujo de gas, por ejemplo, por aire caliente. La irradiación se puede lograr por una lámpara UV o una IR. El secado se puede lograr a una temperatura en un intervalo de desde 20 a 40 °C, o en un intervalo de desde 25 a 35 °C. El secado se proporciona durante un período de tiempo en un intervalo de desde 1 minuto a 24 horas, o en un intervalo de 30 minutos a 10 horas, o en un intervalo de 1 hora a 5 horas. Secando la fase líquida y/o la pasta sobre el sustrato, se proporciona el electrodo de trabajo.

35 Con estos procedimientos de aplicación o superposición es posible crear un patrón del primer material de electrodo sobre la superficie del sustrato. Se puede formar al menos un punto, una línea o una cuadrícula del primer material de electrodo por el procedimiento de superposición. El al menos un punto o línea puede tener un diámetro o ancho en un intervalo de desde 0,01 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,05 a 5 mm, o en un intervalo de desde 0,1 a 1 mm. Las líneas de la cuadrícula se pueden encontrar en los mismos intervalos que se mencionan para los puntos. Los puntos o las líneas de la cuadrícula pueden tener una distancia o tamaño de malla en un intervalo de desde 0,05 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,1 a 5 mm, o en un intervalo de desde 0,5 a 3 mm. El al menos un punto, línea o cuadrícula formada del primer material de electrodo puede formar el al menos un electrodo de trabajo o una parte del mismo. Los puntos o líneas en una cuadrícula pueden tener las mismas o diferentes extensiones, especialmente el mismo o diferente ancho y largo. La longitud de las líneas de la cuadrícula se puede encontrar en un intervalo de desde 0,01 a 50 mm, o en un intervalo de desde 0,05 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,1 a 5 mm. La altura de los puntos o líneas puede estar en un intervalo de 0,01 a 10 mm, o en un intervalo de desde 0,1 a 5 mm, o en un intervalo de desde 0,5 a 2 mm.

50 El electrodo de trabajo forma al menos una almohadilla de electrodo de trabajo, en la que la muestra es directa o indirectamente aplicable a la almohadilla de electrodo de trabajo. Cada almohadilla de electrodo de trabajo está preferentemente formada por al menos un punto, una línea o una cuadrícula, de los que cada uno puede formar un área coherente del primer material de electrodo. Si se superpone más de un punto, línea o cuadrícula del primer material de electrodo sobre el material conductor, el sensor proporciona más de una almohadilla de electrodo. Todas las almohadillas de electrodos conjuntamente construyen el electrodo de trabajo. El sensor puede comprender un electrodo de trabajo con un número de almohadillas de electrodo en un intervalo de desde 1 a 50, o en un intervalo de 2 a 30, o en un intervalo de 5 a 20 almohadillas de electrodo.

60 Como se explica anteriormente, específicamente en el caso de que el sensor sea implantable en un tejido corporal de un usuario, el sensor puede estar total o parcialmente cubierto por al menos una capa protectora, tal como una membrana biocompatible, tal como una membrana de polimetacrilato, específicamente una membrana que cubre la al menos una almohadilla de electrodo de trabajo.

65 Además, se proporciona un modo de realización del sensor, en el que el material conductor de la almohadilla de electrodo de trabajo está eléctricamente conectado a al menos un cable de contacto eléctricamente conductor.

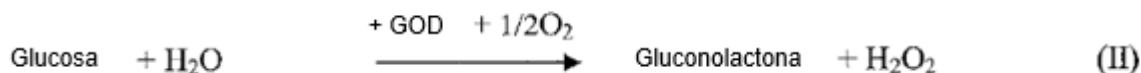
Se proporciona otro modo de realización del sensor, en el que el primer material de electrodo comprende partículas

de Mn_2O_3 en un intervalo de desde un 1 a un 90 % en peso, o en un intervalo de desde un 3 a un 80 % en peso o en un intervalo de desde un 5 a un 50 % en peso en base al peso total del primer material de electrodo, preferentemente en un estado totalmente seco.

5 La oxidasa se selecciona del grupo que consiste en una alcohol oxidasa, una glucosa oxidasa, una uricasa, monoamino oxidasa, citocromo P450 oxidasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, L-gulonolactona oxidasa, lacasa, lisil oxidasa o una mezcla de al menos dos de las mismas. En un modo de realización preferente del sensor, la enzima es glucosa oxidasa (GOD).

10 El primer material de electrodo se adapta de modo que se genera H_2O_2 en la reacción de detección.

15 Cuando se proporciona el sensor como un sensor electroquímico, el H_2O_2 se puede reducir en el electrodo de trabajo para generar una corriente eléctrica que se puede detectar. El H_2O_2 se forma preferentemente en la reacción de detección del analito con el material de detección en una relación estequiométrica. Estequiométrica significa, en el sentido de la invención, que la reacción de detección de una molécula de analito produce un número natural de moléculas de H_2O_2 o que la molécula de H_2O_2 que se construye durante la reacción de detección se construye a partir de una o más moléculas de analito. Preferentemente, en la reacción de detección se forman una, dos o más moléculas de H_2O_2 durante la reacción de una molécula de analito. Por ejemplo, durante la reacción de una molécula de glucosa con la enzima GOD en un entorno acuoso, se genera un H_2O_2 de acuerdo con la ecuación II:



De acuerdo con la ecuación (I), como se describe anteriormente, la molécula de H_2O_2 se puede oxidar en el electrodo de trabajo.

25 Para lograr un sensor con una baja resistencia y por lo tanto una baja demanda de energía, los componentes del sensor se deben seleccionar apropiadamente. Durante la reacción de acuerdo con la ecuación (I) se produce o se puede medir una corriente al cerrar un circuito eléctrico apropiado. La corriente se debe conducir desde el electrodo de trabajo hasta el dispositivo de detección. Esto se puede lograr por la conexión del primer material de electrodo con el material conductor. El material conductor debería poder conducir una corriente eléctrica y ser eléctricamente conectable a un dispositivo de detección. El dispositivo de detección puede comprender al menos un dispositivo de medición de corriente y/o al menos un dispositivo de medición de voltaje, tal como un potenciómetro o un potencióstato. En el documento WO 2007/071562 A1 se dan ejemplos de una configuración de medición apropiada que incluye un dispositivo de detección. Otros dispositivos de detección son factibles.

35 El material conductor comprende un componente seleccionado del grupo que consiste en oro, platino, paladio, plata o una mezcla de al menos dos de los mismos. El material conductor puede formar los cables de contacto. Los cables de contacto pueden tener un espesor en un intervalo de desde 10 a 250 μm , o en un intervalo de desde 30 a 180 μm , o en un intervalo de desde 50 a 150 μm .

40 Al menos a una parte del sensor se superpone una capa protectora. Normalmente, la capa protectora se utiliza en un biosensor que se introduce en el cuerpo, tal como un tejido corporal y/o un vaso sanguíneo, de un usuario, tal como un paciente. La función de la capa protectora puede ser convertir el sensor en un dispositivo biocompatible. Preferentemente, la capa protectora puede ser o puede comprender al menos una membrana. La capa protectora puede ser la capa que entra en contacto con partes de un cuerpo, como líquido intersticial, sangre o tejido de un paciente cuando el sensor se implementa en el cuerpo del paciente. La capa protectora puede servir como capa biocompatible. Por lo tanto, la capa protectora puede comprender al menos parcialmente un material biocompatible. La capa protectora puede comprender un material biocompatible en un intervalo de desde un 50 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 70 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 90 a un 100 % en peso en base al peso total de la capa protectora. Un material biocompatible es un material que no afecta negativamente a un cuerpo vivo al entrar en contacto con el cuerpo vivo. Para determinar si un material es biocompatible, el material se puede usar de acuerdo con la norma ISO 10993. La capa protectora puede comprender un polímero y una proteína o una mezcla de los mismos. El polímero se puede seleccionar del grupo que consiste en un polimetacrilato, un poliuretano (PU), un poli(alcohol vinílico) (PVA), una poliimida y un cuprofano (CUP) o una mezcla de al menos dos de los mismos. Preferentemente, la capa protectora comprende poli(2-metacriloxietil-fosforilcolina-co-n-butilmetacrilato) (MPC). El MPC se puede disolver en etanol.

55 El sustrato comprende un material biocompatible. El material biocompatible puede ser el mismo que se menciona en el contexto de la capa protectora. El sustrato puede comprender la capa biocompatible en un intervalo de desde un 1 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 30 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 50 a un 100 % en peso.

El sensor comprende al menos un electrodo adicional seleccionado del grupo que consiste en un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de referencia y contraelectrodo combinados. Por tanto, como ejemplo, el sensor puede ser un sensor de una configuración de dos electrodos, que comprende al menos un electrodo de trabajo y al menos un contraelectrodo/electrodo de referencia combinados, o el sensor puede ser un sensor de una configuración de tres electrodos, que comprende al menos un electrodo de trabajo, al menos un contraelectrodo y al menos un electrodo de referencia que está separado del contraelectrodo.

El electrodo adicional comprende otro material de electrodo. El contraelectrodo puede comprender al menos un material de electrodo, preferentemente un material de electrodo conductor tal como un metal. El metal se puede seleccionar del grupo que consiste en Au, Ag, Pd, Pt o una mezcla de al menos dos de los mismos. El electrodo de referencia puede comprender otro material de electrodo seleccionado del grupo que consiste en un metal, un sulfato metálico y un haluro metálico o una mezcla de los mismos. El metal se puede seleccionar del grupo que consiste en Au, Ni, Ag, Hg, Cu, Pd, Pt o una mezcla de al menos dos de los mismos. El haluro metálico se puede seleccionar del grupo que consiste en AgCl, AgBr, AgI, Hg₂Cl₂, CuSO₄ o una mezcla de los mismos. El electrodo de referencia puede comprender una mezcla de Ag y AgCl en un intervalo de desde un 1 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 30 a un 100 % en peso, o en un intervalo de desde un 50 a un 100 % en peso en base al peso total del electrodo de referencia. El contraelectrodo puede comprender los mismos componentes que el electrodo de trabajo, al lado del material de detección. Por ejemplo, el contraelectrodo puede comprender grafito. El contraelectrodo puede tener un tamaño donde sea prescindible un electrodo de referencia adicional. Por ejemplo, el contraelectrodo tiene un tamaño para el que el potencial no cambia más de 10 mV durante una operación del sensor midiendo corrientes.

Ejemplos:

1. Preparación de electrodos de trabajo

Para preparar un electrodo de trabajo sobre el sustrato del sensor se superpone una fase líquida y/o una pasta sobre una parte del material conductor que superpone al menos una parte de la superficie de sensor sobre el sustrato. La fase líquida y/o la pasta en forma de pasta para formar un electrodo de trabajo comprende los siguientes componentes:

- un 66,80 % en peso de grafito PE401 de Acheson Industries Deutschland (Alemania);
- un 0,8 % en peso de glucosa oxidasa de Roche Diagnostics GmbH, Alemania;
- un 15,4 % en peso de partículas de Mn₂O₃ de Strem Chemicals Inc., Alemania;
- un 17 % en peso de DEGMBE, de Merck KGaA, Alemania.

El grafito PE401 comprende:

- un 36 % en peso de grafito;
- un 64 % en peso de disolvente desconocido

Los componentes se mezclan dos veces durante 5 minutos en un mezclador rápido (Hauschild & Co KG, Alemania) a 3000 rpm. La mezcla se aplica a la superficie de sensor para superponer al menos una parte del material conductor. La mezcla se seca a vacío durante 240 minutos a temperatura ambiente.

2. Preparación de electrodos de referencia

Para preparar un electrodo de referencia sobre el sustrato del sensor se superpone una fase líquida y/o una pasta sobre una parte del material conductor que superpone al menos una parte de la superficie de sensor sobre el sustrato. La fase líquida y/o la pasta para formar un electrodo de referencia comprende los siguientes componentes:

- un 94 % en peso de Electrodag 6037SS de Acheson Industries Deutschland (Alemania);
- un 6 % en peso de DEGMBE de Merck KGaA, Alemania

Los componentes se mezclan 4 veces durante 15 segundos en un mezclador de velocidad (Hauschild & Co KG, Alemania) a 3000 rpm. La mezcla se aplica a la superficie de sensor para superponer al menos una parte del material conductor. La mezcla se seca durante 120 minutos a 80 °C a presión normal.

3. Preparación de contraelectrodos

Para preparar un contraelectrodo sobre el sustrato del sensor se superpone una fase líquida y/o una pasta sobre una parte del material conductor que superpone al menos una parte de la superficie de sensor sobre el sustrato. La fase líquida y/o la pasta para formar un contraelectrodo comprende los siguientes componentes:

- 5 • un 94 % en peso de grafito PE401 de Acheson Industries Deutschland (Alemania);
- un 6 % en peso de DEGMBE de Merck KGaA, Alemania

El grafito PE401 comprende:

- 10 • un 36 % en peso de grafito;
- un 64 % en peso de disolvente desconocido

15 Los componentes se mezclan durante 5 minutos en un mezclador de velocidad (Hauschild & Co KG, Alemania) a 3000 rpm. La mezcla se aplica a la superficie de sensor para superponer al menos una parte del material conductor. La mezcla se seca durante 120 minutos a 80 °C.

20 Descripción de las figuras:

Otros rasgos característicos y modos de realización opcionales de la invención se divulgarán con más detalle en la posterior descripción de modos de realización preferentes. En los mismos, los rasgos característicos opcionales respectivos se pueden lograr de forma aislada así como en cualquier combinación factible arbitraria, como se dará cuenta el experto en la técnica. El alcance de la invención no está restringido por los modos de realización preferentes. Los modos de realización se representan esquemáticamente en las figuras. En las mismas, los números de referencia idénticos en estas figuras se refieren a elementos idénticos o funcionalmente comparables.

En las figuras:

30 la figura 1a: muestra una vista en planta esquemática de un sensor que no está de acuerdo con la invención con un electrodo de trabajo, uno de referencia y un contraelectrodo;

la figura 1b muestra una vista lateral esquemática de un sensor que no está de acuerdo con la invención con un electrodo de trabajo, uno de referencia y un contraelectrodo;

35 la figura 2: muestra un diagrama de los resultados de medición de dos electrodos, uno con y uno sin Mn_2O_3 ;

la figura 3: muestra un diagrama de los resultados de medición de un sensor con matriz de Mn_2O_3 -GOD-grafito para diferentes concentraciones de glucosa;

40 la figura 4: muestra un diagrama de bloques de los resultados de un sensor con matriz de Mn_2O_3 -GOD-grafito en solución de glucosa 10 mM para diferentes moléculas de interferencia;

45 la figura 5 muestra una vista esquemática de un sistema sensor que no está de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el sistema sensor un dispositivo de detección;

la figura 6 muestra un esquema de un procedimiento de producción de un sensor que no está de acuerdo con la invención.

50 Descripción detallada de las figuras

En la figura 1a se muestra una vista en planta esquemática de un sensor 2 que no está de acuerdo con la invención. El sensor 2 comprende un sustrato 4 fabricado de una lámina Melinex® de DuPont Teijin Films, Europa. El sensor 2 tiene conformación rectangular; sin embargo, el sensor 2 puede tener cualquier forma que sea adecuada para detectar un analito en una muestra 26. En este ejemplo, el sensor 2 tiene una longitud de 2 cm, un ancho de 0,5 mm y una altura de 0,15 mm en la región de contacto 16. La altura del resto del sensor 2 puede ser superior a 0,15 mm ya que los electrodos 6, 10, 12 y/o la capa de aislamiento 18 pueden ser más gruesas en esta región del sensor 2. La altura del sensor en la región exterior a la región de contacto puede estar en el intervalo de 0,15 a 2 mm.

60 En una superficie de sensor 20 del sustrato 4, se sitúan tres cables de contacto conductores 28 uno al lado del otro con una distancia de 0,05 mm cada uno. El ancho de cada cable de contacto conductor 28 es de 0,05 mm. Los cables de contacto conductores 28 construyen tres líneas paralelas fabricadas de oro. En un extremo del sustrato 4, en la figura 1 en el lado izquierdo, se sitúa una región de contacto 16. Los puntos de partida de los cables de contacto conductores 28 construyen una línea perpendicular al borde izquierdo del sustrato 4. La longitud de cada cable de contacto conductor 28 puede variar dependiendo del electrodo con el que se ponen en contacto. En este

ejemplo, el cable de contacto conductor 28 en la mitad del sensor 2 es el más corto ya que se pone en contacto con el electrodo de referencia 10. Los cables de contacto conductores 28 tienen una longitud en un intervalo de 1,5 a 1,9 cm. El cable conductor 28 más largo es el que se pone en contacto con el contraelectrodo 12. El cable de contacto conductor 28 en contacto con el electrodo de trabajo 6 proporciona una curva en el extremo derecho del sustrato 4 para lograr que el primer material de electrodo 24 se pueda situar en el eje central 80 del sensor 2.

El sustrato 4 puede expandir su ancho en la región de contacto 16 del sensor 2. La región de contacto 16 puede tener una dimensión de 0,5 cm de largo, 4,5 mm de ancho y 0,15 mm de alto. Por tanto, el ancho del sensor 2 se amplía en esta parte del sensor 2. La región de contacto 16 ensanchada del sustrato 4 se puede situar asimétricamente, solo en un lado del sensor 2 o simétricamente en ambos lados del sensor 2.

En la región de contacto 16 los cables de contacto conductores 28 también pueden ser más anchos que en el resto del sustrato 4. En la región de contacto 16, los cables de contacto conductores 28 tienen un ancho de 1 mm sobre una longitud de 0,5 cm. La altura sigue siendo la misma que se mencionó anteriormente. En la región de contacto 16 del sensor 2 terminan los cables de contacto conductores 28. Esta es la región donde se puede conectar un dispositivo de detección 52 con el sensor 2 como se muestra en la figura 5. En los tres cables conductores 28, se sitúan tres materiales de electrodos 24, 24' diferentes. El electrodo de trabajo 6 comprende un primer material de electrodo 24, en forma de una matriz de grafito con glucosa oxidasa y Mn_2O_3 . El electrodo de referencia 10 comprende otro material de electrodo 24', en forma de $Ag/AgCl$ y el contraelectrodo 12 comprende otro material de electrodo como se describe en los ejemplos.

Una capa de aislamiento 18 cubre el electrodo de trabajo 6, el electrodo de referencia 10 y el contraelectrodo 12. La capa de aislamiento 18 también puede cubrir la mayor parte del sustrato 4 y los cables de contacto conductores 28. La altura de la capa de aislamiento 18 está en el intervalo de desde 0,01 a 0,02 mm. Sin embargo, un extremo de cada uno de los cables de contacto conductores 28 no está cubierto por la capa de aislamiento 18. De forma alternativa, la capa de aislamiento proporciona al menos un orificio para ponerse en contacto con los cables de contacto 28. Esta es la parte del sensor 2 que se puede poner en contacto con el dispositivo de detección 52. La posición de los electrodos 6, 10, 12 puede variar. No es obligatorio que el electrodo de trabajo 6 se sitúe en la mitad de los tres electrodos 6, 10, 12. También es posible situar el electrodo de referencia 10 o el contraelectrodo 12 en la mitad del sustrato 4. Si el sensor 2 se recubrió por inmersión para cubrirlo con una capa protectora, la superficie opuesta a la superficie de sensor 20 ilustrada también está cubierta por la capa protectora (no mostrada aquí).

En la figura 1b, se muestra el sensor 2 como una vista lateral. En comparación con la vista en planta de la figura 1a, el sensor 2 mostrado en la figura 1a gira 90° alrededor de la línea discontinua 80 en la mitad del sensor 2. En esta vista lateral se ilustra la secuencia de los materiales del sensor 2. El sensor 2 de la figura 1b muestra una estructura en capas. En la parte inferior del sensor 2, el sustrato 4 construye la primera capa como base del sensor 2.

Sobre el sustrato 2 se sitúa una capa de un cable de contacto conductor 28. En los cables de contacto conductores 28 se sitúa una capa de aislamiento 18, al lado de la región de contacto 16 y la parte del material conductor 22 donde se sitúa el primer material de electrodo 24 para construir el electrodo de trabajo 6, otro material de electrodo 24' para construir el electrodo de referencia 10 y otro material de electrodo para construir el contraelectrodo 12. En la vista lateral no se muestra el detalle de que el cable de contacto conductor 28 está conectado al otro material de electrodo 24' del electrodo de referencia 10.

Se podría proporcionar una capa protectora adicional, tal como una membrana de difusión, en todo el sensor 2 al lado de la región de contacto 16. Además, una capa protectora puede cubrir el sensor 2 al lado de la región de contacto 16. La capa protectora puede ser un material biocompatible cuando el sensor se debe introducir al menos parcialmente en un cuerpo humano.

La figura 2 muestra un diagrama de los valores de medición 34, 36 de dos sensores a diferentes voltajes de polarización a una concentración constante de H_2O_2 como analito. Uno de los sensores comprendía un electrodo de trabajo 6 de PE401 (Acheson, véanse los ejemplos) y está simbolizado por los cuadrados 36. El otro sensor comprendía un electrodo de trabajo 6 con Mn_2O_3 que comprendía un 84,6 % en peso (PE401 de Acheson), un 15,4 % en peso de Mn_2O_3 , simbolizado por los rombos 34. Los contraelectrodos 12 de ambos sensores comprendían un 100 % en peso de PE401 de Acheson. El electrodo de referencia 10 de ambos sensores comprendía Electrodag 6037SS (Acheson). Los dos sensores con y sin Mn_2O_3 que dieron como resultado los valores de medición 34 y 36 comprendían ambos una composición similar de los contraelectrodos 12.

Para la medición mostrada en la figura 2, los dos sensores se situaron independientemente en un tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 con NaCl 147 mM y H_2O_2 50 μM de manera que los electrodos 6, 10, 12 se sumergen en la solución tampón.

La solución tampón se preparó disolviendo las sales mencionadas en agua desionizada por Milli-Q Academic (Merck Millipore) durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C antes de añadir el H_2O_2 . Los sensores se sumergieron en la solución tampón así preparada.

Los sensores se pusieron en contacto por la región de contacto con un potencióstato G300 Gamry de Gamry Instruments (EE. UU.). La fuente de alimentación se reguló para suministrar 325 mV (frente a Ag/AgCl, KCl 3 M) entre el electrodo de trabajo y el de referencia al comienzo de la medición. Este voltaje se fijó durante 10 minutos. Después de ese período, se cambió el voltaje ocho veces a otro voltaje de 50 mV menos que el voltaje anterior que terminaba en -75 mV. Después de cada cambio de voltaje se estableció una medición de la corriente durante 10 minutos. Se midió la corriente por el dispositivo de detección. Los resultados para el sensor que comprende Mn₂O₃ y para el sensor sin Mn₂O₃ se muestran en la figura 2.

La comparación de los valores de medición 34 del sensor con Mn₂O₃ y los del sensor sin Mn₂O₃ ilustrados como puntos 36, mostrados en la figura 2, muestran que el electrodo de grafito 10 del sensor sin Mn₂O₃ con valores de medición 36 no produce un flujo de corriente cuando se sumerge en una solución que comprende H₂O₂; independiente del voltaje de polarización aplicado en un intervalo de desde -75 mV a 325 mV. Sin embargo, el sensor con Mn₂O₃ representado por los valores de medición 34 muestra un cambio de corriente que comienza de 325 mV a aproximadamente 175 mV. De 175 mV a 25 mV el sensor con Mn₂O₃ produce una corriente constante en un intervalo de -25 a 40 nA. No antes de la disminución del voltaje a 25 mV y menos, el sensor con Mn₂O₃ produce resultados de corriente estables. El incremento de la corriente más allá de los 25 mV a voltajes negativos, da como resultado una reacción del electrodo con el oxígeno O₂ incluido en la solución. Este es un resultado notable ya que los electrodos con diferentes catalizadores que comprenden metales producen una reacción con H₂O₂ a voltajes menores. Es un resultado asombroso que un sensor pueda funcionar con voltajes tan bajos sin la interferencia de la reacción del oxígeno.

La figura 3 muestra un diagrama de una medición de un sensor 2 con un electrodo de trabajo 6 que comprende grafito, GOD y Mn₂O₃, un electrodo de referencia 10 y un contraelectrodo 12, todos preparados como se describe en la sección de ejemplo anterior. El sensor 2 se sumergió en una solución tampón preparada para los experimentos de la figura 2 sin la adición de H₂O₂. La configuración del sistema de medición fue la misma que para los experimentos de la figura 2. A un voltaje de 125 mV entre el electrodo de trabajo 6 y el electrodo de referencia 10, se midió la corriente por el dispositivo de detección. Después de 25 minutos de equilibrado, se midió una corriente de 0,8 nA. Después de esta medición, el sensor 2 se sumergió en una solución tampón como se describe anteriormente con glucosa 5 mM. Después de 25 minutos de equilibrado, se midió de nuevo la corriente. La corriente cambió a 3,8 nA, como muestran los valores de medición 34. Esto se repitió para una concentración de 10, 15, 20 y 25 mM de glucosa en el mismo como se describe anteriormente. Los valores de medición 34 de la figura 3 muestran un incremento lineal de la corriente por un incremento de la concentración de glucosa. No se midió una alteración del oxígeno durante estas mediciones.

En la figura 4 se muestra la influencia en los resultados de medición de un sensor como se describe en la figura 3 añadiendo diferentes materiales de interferencia. A un voltaje de 125 mV entre el electrodo de trabajo 6 y el electrodo de referencia 10, se midió la corriente por el dispositivo de detección. El primer bloque 40 representa el porcentaje de interferencia con la señal cuando se añadieron 2 mg/dl de ácido ascórbico a una solución tampón como se describe para las mediciones en las figuras 2 y 3, que contenía glucosa con una concentración de 10 mM. Después de 25 minutos de equilibrado, se midió la corriente. Se usó el mismo tampón para las mediciones de interferencia del segundo bloque 44 que representa la alteración del ácido úrico con una concentración de 8 mg/dl. Un tercer material de interferencia fue paracetamol en una concentración de 3 mg/dl representado por el tercer bloque 46 del diagrama de bloques.

Como se puede ver en el diagrama, la interferencia del ácido úrico es la mayor. Aquí se provoca un incremento de la señal añadiendo ácido úrico a la solución de muestra. El paracetamol tiene un efecto decreciente sobre la señal del sensor. La alteración del ácido ascórbico y el paracetamol está en el intervalo del error normal de medición. Como las tres sustancias de interferencia muestran una interferencia de señal muy baja, el error medido del sensor se ha reducido en comparación con los sensores del estado de la técnica.

En la figura 5 se muestra un sistema sensor 50 que no está de acuerdo con la presente invención. Un sensor 2, con la misma geometría y componentes como se describe en la figura 1a y 1b, se sitúa con su región de contacto 16 en un dispositivo detector 52. El dispositivo detector 52 proporciona al menos un contacto 54 para ponerse en contacto con los cables de contacto conductores 28 que dan lugar al electrodo de trabajo 6, el electrodo de referencia 10 y el contraelectrodo 12. Preferentemente, cada cable de contacto conductor 28 está en contacto con un contacto 54 del dispositivo detector 52. El dispositivo detector 52 puede producir y mantener un voltaje constante entre el electrodo de trabajo 6 y el electrodo de referencia 10. Manteniendo constante el voltaje, la corriente medida entre el electrodo de trabajo 6 y el contraelectrodo 12 produce la señal de medición que es proporcional a la concentración de analito, al aplicar las fórmulas I y II. Esta corriente se mide por un detector eléctrico 56 que mide la corriente entre los electrodos 6 y 12, que forma parte del dispositivo detector 52.

En la figura 6 se muestra un esquema del procedimiento de fabricación de un sensor que no está de acuerdo con la invención. En una primera etapa P1 60 se proporciona el sustrato 4, en el que el sustrato 4 comprende una superficie de sensor 20. Proporcionar el sustrato en la primera etapa P1 60 se logra desenrollando una lámina de poliimida que está almacenada en un rodillo. La lámina tiene un espesor de 0,5 mm. Un extremo de la lámina se enrolla alrededor de un segundo rodillo. La distancia de los rodillos está en un intervalo de desde 1 a 100 m. En un

ejemplo, la distancia es de aproximadamente 10 m. La lámina tiene un ancho de 1 m. La conformación del sensor está repujada aproximadamente 100 veces por metro en la lámina. En la segunda etapa P2 62 se aplica un material conductor 22 en forma de oro a la superficie de sensor 22 por un procedimiento de pulverización catódica. Los cables de contacto conductores 28 se forman a partir de la capa de oro raspando las partes superfluas de oro. En cada superficie de sensor 20 de los sensores repujados 2, el primer material de electrodo 24 se aplica a los cables de contacto conductores 28 en la tercera etapa P3 64 para formar un electrodo de trabajo 6 o una almohadilla de electrodo de trabajo 8. El primer material de electrodo 24 se aplica a los cables de contacto conductores 28 de una manera como se describe en el ejemplo 1 anterior. De acuerdo con una cuarta etapa P4 66, el electrodo de referencia 10 y/o el contraelectrodo 12 se aplican a los cables de contacto conductores 28 como se describe en los ejemplos 2 o 3 anteriores. Opcionalmente se puede aplicar una quinta etapa P5 (no mostrada) para cubrir al menos una parte del sensor 2 con una membrana biocompatible y/o una capa protectora. Esto se logra de acuerdo con el ejemplo 4 como se describe anteriormente.

Lista de números de referencia

15	2	sensor
	4	sustrato
20	6	electrodo de trabajo
	8	almohadilla de electrodo de trabajo
	10	electrodo de referencia o adicional
25	12	contraelectrodo o electrodo adicional
	16	región de contacto
30	18	capa de aislamiento
	20	superficie de sensor
	22	material conductor
35	24	primer material de electrodo
	24'	otro material de electrodo
40	26	muestra
	28	cable de contacto conductor
	30	eje x
45	32	eje y
	34	valores de medición del sensor con Mn ₂ O ₃
50	36	valores de medición del sensor sin Mn ₂ O ₃
	40	primer bloque / 2 mg/dl de ácido ascórbico
	44	segundo bloque / 8 mg/dl de ácido úrico
55	46	tercer bloque / 3 mg/dl de paracetamol
	50	sistema sensor
60	52	dispositivo detector
	54	contacto
	56	detector eléctrico
65	60	etapa 1

ES 2 922 701 T3

62	etapa 2
64	etapa 3
5 66	etapa 4
80	línea discontinua / eje central del sensor 2

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un analito que puede generar H_2O_2 en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 S1. proporcionar un sensor (2), comprendiendo el sensor (2):
- a. un material conductor (22);
- 10 b. un primer material de electrodo (24) que se superpone al menos a una parte del material conductor (22) para formar un electrodo de trabajo (6),
- en el que el primer material de electrodo (24) se adapta para realizar al menos una reacción de detección cuando el analito está presente en la muestra,
- 15 y en el que se genera H_2O_2 en la reacción de detección, en el que el primer material de electrodo comprende partículas de Mn_2O_3 ; y en el que el primer material de electrodo comprende además una enzima, en el que la enzima es una oxidasa;
- 20 S2. aplicar un voltaje al electrodo de trabajo (6);
- en el que el voltaje se selecciona del intervalo de voltaje en el que el H_2O_2 en la muestra se reducirá en el electrodo de trabajo (6) generando de este modo una corriente eléctrica,
- 25 en el que el voltaje está en un intervalo de desde 50 a 150 mV si se compara con un electrodo de referencia que comprende Ag/AgCl con KCl 3 M,
- comprendiendo además el procedimiento la detección de la corriente eléctrica, en el que la corriente eléctrica corresponde a una medida de una concentración del analito en la muestra.
- 30

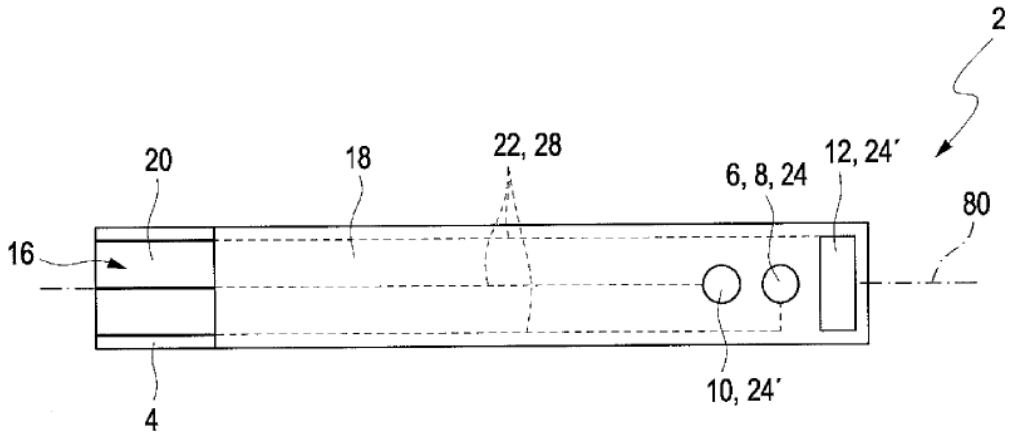


Fig. 1 a

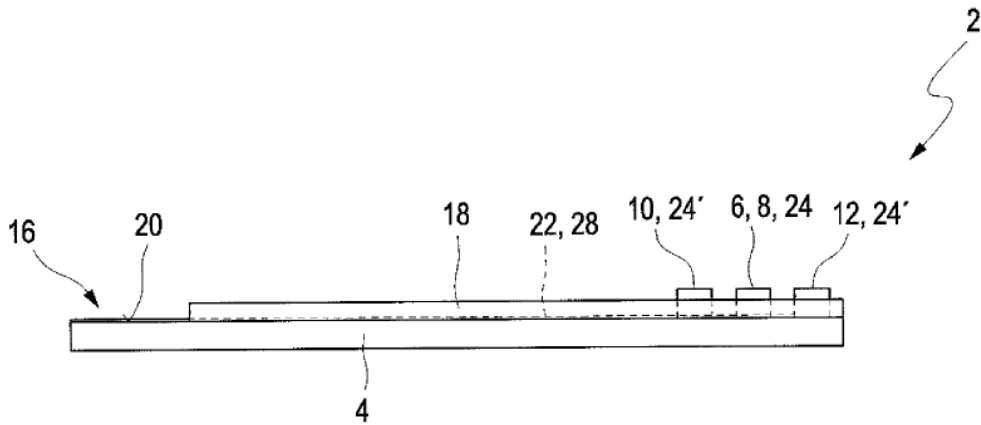


Fig. 1 b

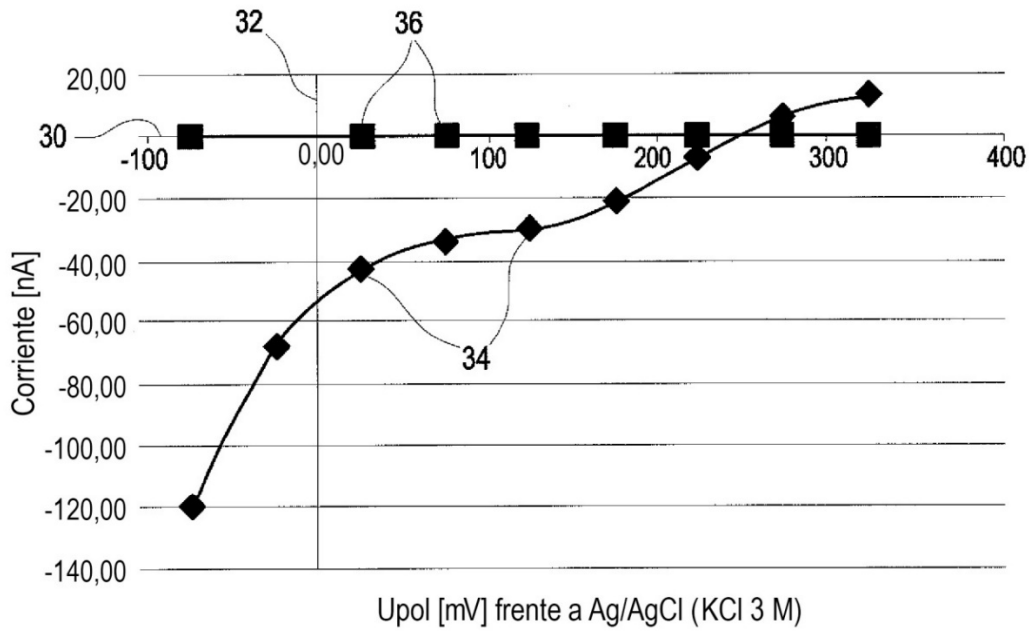


Fig. 2

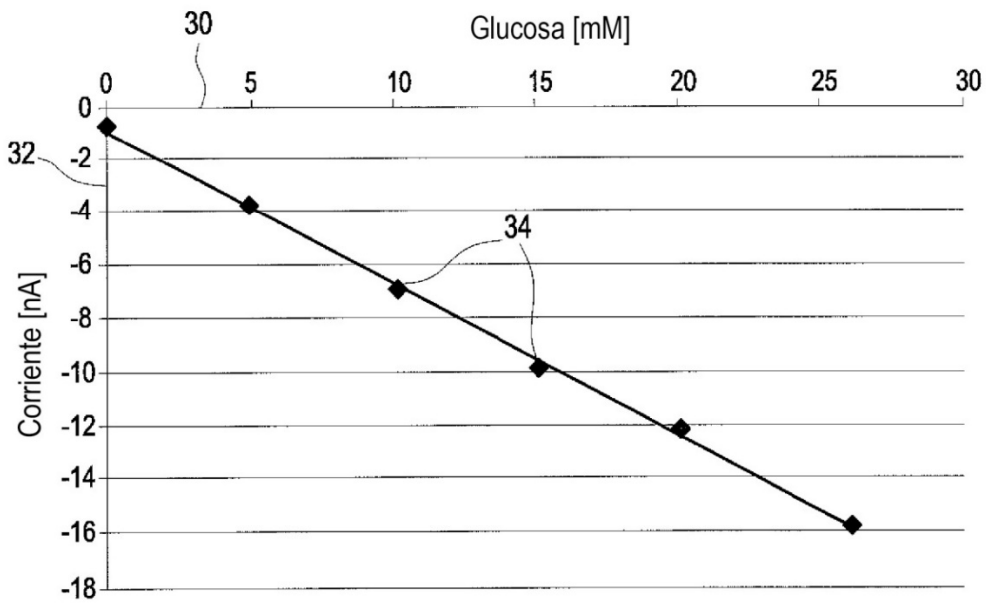


Fig. 3

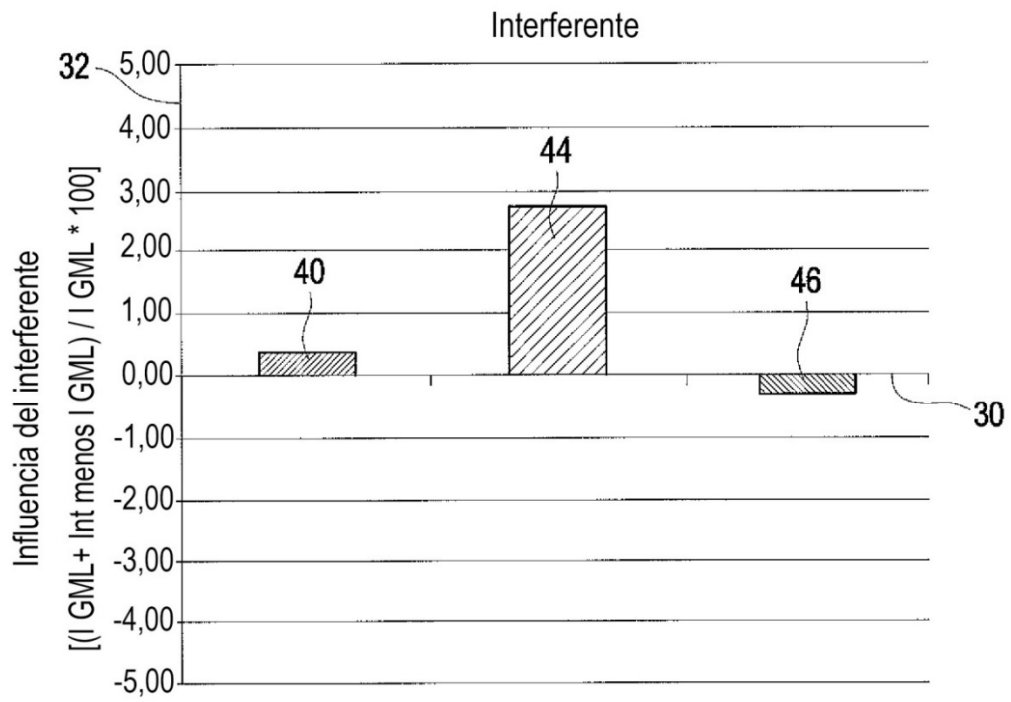


Fig. 4

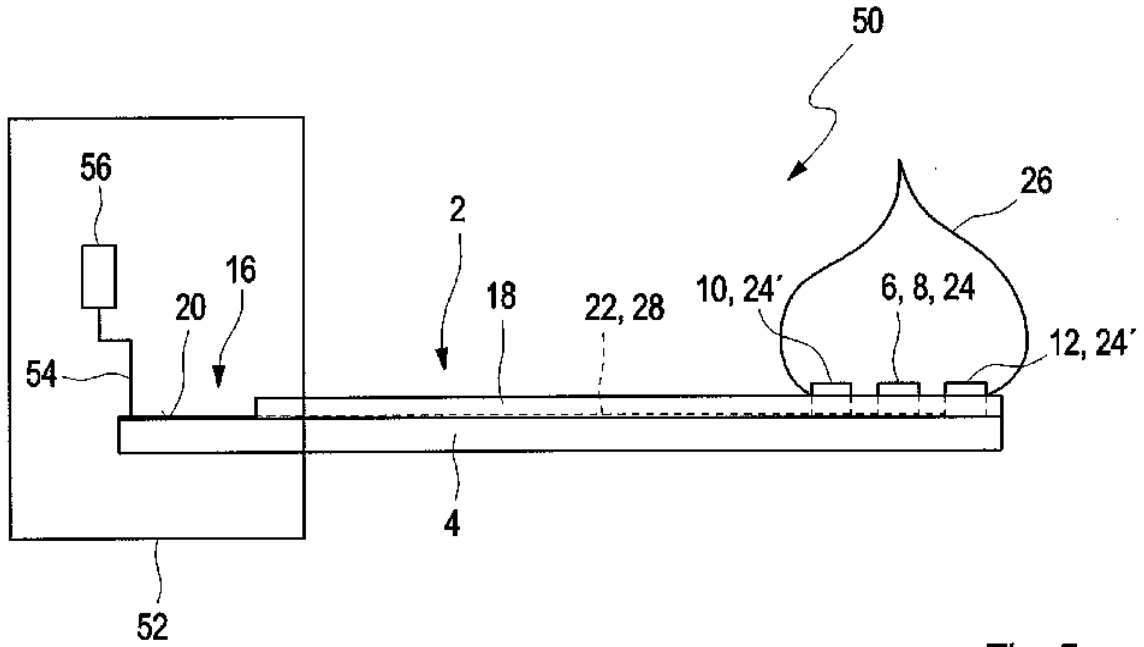


Fig. 5

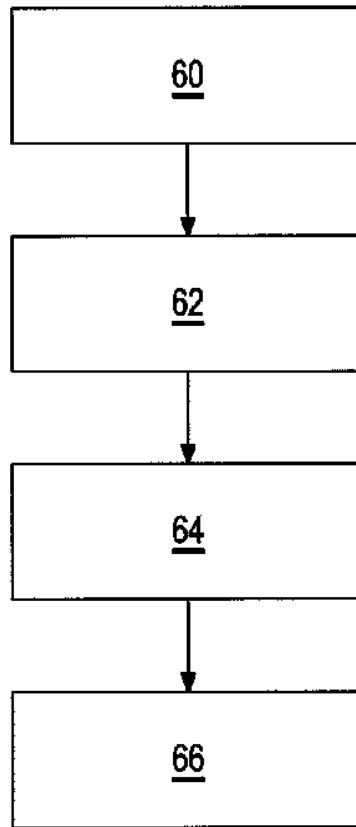


Fig. 6