



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/26 (2006.01) *G01N 27/403* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070873

(22) Fecha de presentación internacional:
9 de diciembre de 2016 (09.12.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 201531788
10 de diciembre de 2015 (10.12.2015) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];
C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **DEL CAMPO GARCÍA, Francisco Javier**;
Instituto de Microelectronica de Barcelona (IMB-CNM),
Campus Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra),
08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona) (ES).
GUIMERÁ BRUNET, Antón; Instituto de
Microelectronica de Barcelona (IMB-CNM), Campus
Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra), 08193

Cerdanyola del Vallès (Barcelona) (ES). **KITSARA, María**; Instituto de Microelectronica de Barcelona (IMB-CNM), Campus Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra), 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona) (ES). **ALLER PELLITERO, Miguel**; Instituto de Microelectronica de Barcelona (IMB-CNM), Campus Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra), 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ELECTROCHROMIC BIOSENSOR

(54) Título : BIOSENSOR ELECTROCRÓMICO

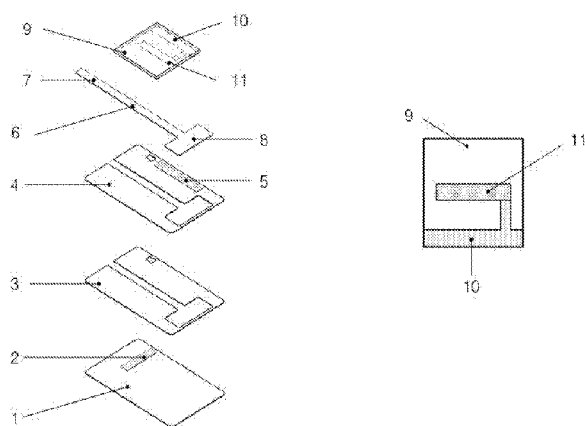


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to a biosensor formed by an anode of a conductive material which contains at least one enzyme immobilised on the surface thereof and a redox mediator, and a cathode of a transparent material which contains an electrochromic molecule that changes colour when its state of oxidation changes. An ion-conductive medium in the form of a permeable membrane or gel is deposited between the anode and the cathode. This biosensor is activated automatically by the deposition of a sample containing an analyte generating an electron flow from the anode to the cathode by the enzymatic reduction/oxidation thereof, which causes the change in colour of the electrochromic material and provides immediate information to the user about the presence of said analyte in the sample.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un biosensor formado por un ánodo de un material conductor que contiene al menos una enzima inmovilizada sobre su superficie y un mediador redox y un cátodo de un material transparente que contiene una molécula electrocrómica que cambia de color cuando cambia su estado de oxidación. Entre ánodo y cátodo se deposita un medio conductor de iones que puede estar en forma de gel o de membrana

permeable. Este biosensor se activa automáticamente cuando se deposita una muestra que contenga el analito cuya oxidación/reducción enzimática genera un flujo de electrones desde el ánodo al cátodo que provoca el cambio de color del material electrocrómico y que da información inmediata al usuario de la presencia de dicho analito en la muestra.



SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

BIOSENSOR ELECTROCRÓMICO

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un biosensor formado por un primer electrodo de un material conductor que contiene al menos una enzima y un mediador redox inmovilizados sobre su superficie y un segundo electrodo de un material transparente que contiene una molécula electrocromica que cambia de color cuando cambia su estado de oxidación. Entre ambos electrodos se deposita un medio conductor de iones
10 que puede estar en forma de gel o de membrana permeable. Por tanto, la presente invención puede englobarse en el campo de la electroquímica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Existe una creciente necesidad de disponer de herramientas que permitan el diagnóstico rápido de determinadas enfermedades (diabetes y problemas cardiovasculares principalmente). La mayoría de estos sistemas para ensayos rápidos se basan en una de dos tecnologías: por un lado encontramos tiras de test colorimétricas, y por otro lado encontramos ensayos basados en una serie de
20 reactivos y un pequeño instrumento de medida o lector. Los tests colorimétricos suelen ser económicos y muy fáciles de usar, pero en la mayoría de los casos sólo ofrecen información cualitativa, y se utilizan sobre todo para discriminar casos positivos de casos negativos. Por otro lado, los sistemas basados en la combinación de reactivos y un lector, si bien son capaces de ofrecer respuestas cuantitativas o al menos
25 semicuantitativas, tienen el inconveniente de plantear un manejo más complejo al necesitar un lector que, además, puede resultar caro. El ejemplo paradigmático de estos sistemas de medida, basados en tiras reactivas más un lector, es el glucómetro.

Un gran número de empresas y grupos de investigación han trabajado en la mejora de
30 ambas tecnologías, aunque siguiendo distintas direcciones. En el caso de los sistemas basados en reactivos y lector, gracias a la disponibilidad de fuentes de energía abundante, tales como baterías y pilas, las mejoras han perseguido simplificar el uso, mejorar la gestión de la información, y reducir el volumen de muestra necesario para su análisis. Por otro lado, en el caso de los sistemas basados en ensayos
35 colorimétricos, el objetivo más buscado ha sido el de la cuantificación de la muestra.

- Para ello, ineludiblemente, todos los esfuerzos y aproximaciones se han apoyado en técnicas de detección convencionales, principalmente ópticas y electroquímicas. El problema de esto es que en el momento en que se introduce un equipo de medida en el sistema, los costes por análisis se disparan y se pierde el interés comercial. Hasta la
- 5 fecha, el único producto en el mercado que permite la cuantificación de un ensayo de flujo lateral, es un sistema para el control de la natalidad que permite identificar los días más fértiles del ciclo menstrual de la mujer. Sin embargo, este sistema, es complejo, caro y tiene un impacto medioambiental importante.
- 10 El concepto de los sensores autoalimentados surge por primera vez en los años 1970s en la industria nuclear. Sin embargo, el primer sensor electroquímico autoalimentado no llega hasta el año 2001 en forma de biosensor (*J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 10752–10753) donde se describieron pilas enzimáticas de combustible capaces de generar electricidad a partir de la glucosa o el lactato presentes en una muestra. Sin
- 15 embargo, la baja cantidad de energía que dichos sistemas eran capaces de generar, no permitía alimentar las funciones adicionales necesarias: principalmente una electrónica de control y alguna forma de poner la información del sensor a disposición del usuario.
- 20 En los documentos US2014/0322617 y US2015/0126834 se describe una pila de combustible biológico que comprende un sustrato que se adhiere a la piel del usuario, un ánodo que incluye un catalizador que facilita la conversión de un sustrato presente en un fluido biológico con la consiguiente liberación de electrones y un cátodo formado por un material electroconductor que contiene un producto capaz de reducir una
- 25 sustancia oxigenada. El ánodo y el cátodo están separados por una interfase que permite el flujo de electrones.
- Liu H. et al describieron un sensor para detectar glucosa en orina artificial que utiliza un electrodo con azul de Prusia electrodepositado sobre una capa fina de ITO como
- 30 indicador electrocrómico y un electrodo de tinta de carbono (*Anal. Chem.* 2012, 84, 2528–2532).
- Jia, W. et al describieron un dispositivo epidérmico para detectar determinadas sustancias en la sudoración formado por un ánodo que contiene la enzima lactato

oxidasa, CNTs, TTF protegido por una membrana de quitosán y un cátodo formado por un material de carbono y platino (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 7233 –7236).

5 Zloczeska, A. et al. describieron un biosensor para detectar ácido ascórbico basado en un ánodo que es un electrodo de ITO modificado con nanomateriales de carbono y un cátodo con una matriz de silicato donde se inmoviliza la enzima bilirrubina-oxidasa y que se protege con una membrana permeable (*Biosensors and Bioelectronics*, 54 (2014) 455-461).

10 Más recientemente, Pinyou et al., han presentado un dispositivo autoalimentado consistente en una pila de combustible de glucosa cuya corriente sirve para reducir un electrodo transparente modificado con verde de metileno. El cambio de color, que se mide mediante un espectrofotómetro, es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra dentro de un rango entre 0 y 1mM (Pinyou, P. et al. *Coupling of*
15 *an enzymatic biofuel cell to an electrochemical cell for self-powered glucose sensing with optical readout. Bioelectrochemistry* 106, 22–27 (2015)).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 Los inventores han desarrollado un biosensor que supera las dificultades existentes en el campo y se compone de una celda galvánica o batería en la que uno de sus electrodos es un sensor electroquímico y el otro un visor electrocrómico. Así, dada la configuración en forma de pila (el potencial del cátodo es superior al potencial del ánodo) al añadir una muestra que contenga un sustrato para la enzima presente en el
25 sistema, el sensor se activa automáticamente, dando información directa al usuario al tiempo que se genera una energía eléctrica disponible para otras funciones.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un biosensor que comprende los siguientes elementos:

- 30 a) un primer electrodo formado por una base de un material conductor que comprende al menos un tipo de enzima inmovilizada sobre su superficie y al menos un mediador redox que facilita el intercambio de carga entre la enzima y el electrodo sobre el que ésta se halla inmovilizada;
- b) un segundo electrodo formado por un material conductor transparente
35 sobre el que se ha depositado un material electrocrómico;

- c) un medio conductor de iones, situado entre ambos electrodos.

El primer electrodo puede estar fabricado en un material conductor que presente buenas propiedades electrocatalíticas, preferiblemente carbono en cualquiera de sus formas, tales como el grafito, nanotubos de carbono, o grafeno, electrodos basados en metales nobles tales como el oro o el platino, u otros materiales conductores habitualmente empleados en la construcción de dispositivos electroquímicos, como el óxido de indio y estaño (ITO), el óxido de antimonio y estaño (ATO), el óxido de flúor y estaño (FTO) o polímeros conductores como el PEDOT:PSS, polianilinas, pirroles, etc.

10

En una realización preferida, el primer electrodo comprende adicionalmente materiales de carbono como grafeno o nanomateriales de carbono. En una realización más preferida, el primer electrodo comprende nanotubos de carbono. Estos materiales pueden mejorar el rendimiento del biosensor al aumentar el área real disponible para la inmovilización y facilitar la transferencia de carga entre el electrodo y las enzimas.

15

En otra realización preferida, el mediador redox de la carga se selecciona de entre ferrocianuros, ferrocenos, complejos de osmio, complejos de rutenio, quinonas, fenotiazinas o fulvalenos. El mediador redox facilita la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo sobre el que ésta (la enzima) se encuentra localizada.

20

En una realización preferida, el mediador redox está incorporado a una estructura polimérica, tales como polietileniminas, cloruros de polivinilo, o polímeros basados en vinilimidazol o en vinilpiridina.

25

En otra realización preferida, el material electrocrómico se selecciona de entre hexacianometalatos, óxidos metálicos, complejos metalocrómicos, polímeros conjugados electrocrómicos, viológenos o porfirinas.

30

En una realización más preferida, el material electrocrómico es el hexacianometalato azul de Prusia.

En otra realización más preferida, los polímeros conjugados electrocrómicos se seleccionan de entre polianilina, polipirrol, politiofeno, PEDOT, polycarbazol, poliazuleno o poliindol.

- 5 El medio conductor de iones puede estar en forma de membrana, de solución rica en electrolitos, de gel, o en cualquier forma que permita el intercambio iónico entre los electrodos. Dicho medio está en contacto con todos los electrodos, y su misión es alojar tanto el electrolito soporte que permite controlar la resistencia interna del dispositivo, como la muestra a analizar. Además, en el caso de membranas de flujo
- 10 laminar, éstas permiten el intercambio de las disoluciones empleadas de forma fácil y cómoda. En una realización preferida, este medio conductor de iones comprende Nafion, chitosan, polietilenimina, derivados de la celulosa, geles de agar o polihema.

- En el biosensor de la invención, la enzima puede ser una oxidasa, deshidrogenasa,
- 15 tirosinasa, etc. En una realización preferida, la enzima se selecciona de entre glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, lactato oxidasa, urato oxidasa, alcohol oxidasa o colesterol oxidasa.

- La inmovilización de la enzima sobre la superficie del ánodo puede ser covalente o no
- 20 covalente.

- En otra realización preferida, el material transparente del cátodo se selecciona de entre ITO, FTO, ATO, PEDOT, o materiales basados en nanohilos metálicos como, por ejemplo, de plata.

25

En otra realización preferida, el biosensor de la invención adicionalmente comprende un soporte permeable que se selecciona de entre un material textil no tejido o de un polímero no permeable.

- 30 En otra realización preferida, el biosensor de la invención adicionalmente comprende una capa adhesiva.

En otra realización preferida, el biosensor de la invención adicionalmente comprende una capa protectora formada por un polímero transparente.

35

En una realización preferida, el primer electrodo funciona como ánodo y el segundo electrodo funciona como cátodo, de forma que en el ánodo se produce la reacción del analito sustrato de la enzima que genera una corriente de electrones que se dirigen por el circuito externo hacia el cátodo, donde reducen el material electrocrómico y provocan su cambio de color.

En otra realización preferida, el primer electrodo funciona como cátodo y el segundo electrodo funciona como ánodo, de forma que en el cátodo se produce una reacción del analito sustrato de la enzima que induce el paso de una corriente de electrones procedente del ánodo, donde el material electrocrómico cambia de color al oxidarse.

En la presente invención se aprovecha la naturaleza electroquímica de tres de los componentes clave en los sistemas de detección, como son el sensor, la fuente de alimentación, y un posible visualizador electrocrómico, fusionando los tres elementos en una única celda galvánica que cumple a la vez las funciones de detección y cuantificación y de visualización del resultado. El sistema funciona en base a una medida de carga, ya que la carga que se genera o se consume en el electrodo sensor, es igualada por otra carga de igual magnitud y signo contrario en el electrodo visualizador. El cambio de color es directamente proporcional a la carga circulante y, mediante un diseño geométrico específico, se consigue transformar el cambio de color en información a través de una escala visual. Esto permite al usuario obtener una lectura directa de la concentración de analito presente en la muestra, sin necesidad de emplear lectores u otro tipo de instrumentación externa.

Esta aproximación es completamente novedosa desde el punto de vista de los dispositivos de análisis para puntos de atención por varias razones. En primer lugar, elimina por completo la necesidad de disponer tanto de una electrónica de control basada en silicio, así como de una fuente de energía adicional. Además, los dispositivos basados en la tecnología de la invención pueden fabricarse íntegramente mediante técnicas de impresión, utilizando para ello materiales biodegradables, con lo que no sólo se consigue abaratar los costes de fabricación, sino que se aumenta la sostenibilidad del proceso ya que se reduce muchísimo el impacto medioambiental de los dispositivos una vez desechados.

La completa eliminación de la necesidad de disponer de electrónica de silicio en un dispositivo que lo contenga supone un avance sin precedentes en el área de los sensores autoalimentados, al eliminar una barrera hasta ahora impensable: la integración heterogénea de componentes electrónicos, incluidos los circuitos integrados habitualmente empleados para la gestión de la energía y el control de los sensores y el visualizador. Las aplicaciones del biosensor de la invención serían innumerables en medicina (medida de glucosa en pacientes diabéticos) y especialmente ventajoso en formatos no invasivos tales como parches cutáneos para la medida de metabolitos en sudor. Otras aplicaciones son como etiquetas para la detección de patógenos en alimentos envasados, medidores de alcohol en saliva, respiración, sudor y bebidas alcohólicas en general, detectores de gases, e incluso dispositivos para la detección rápida de patógenos y sustancias tóxicas en entornos sin recursos. En general, la tecnología es aplicable a la detección de cualquier sustancia capaz de actuar como sustrato de enzimas acoplables a un electrodo.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a un dispositivo que comprende el biosensor según se ha descrito anteriormente.

El dispositivo que contiene el biosensor de la invención presenta tres partes bien diferenciadas: por un lado, la cámara para la muestra, en la que se aloja dicho biosensor, la cámara del visualizador que contiene un electrolito y un electrodo transparente modificado con una capa de material electrocromico, y en tercer lugar el circuito externo que conecta ambos electrodos. El dispositivo funciona efectivamente como una pila en la que el propio analito es el combustible y, por tanto, sirve para activar el dispositivo. Análogamente a otros dispositivos electroquímicos para generación de energía, para que el presente dispositivo funcione adecuadamente, es necesario que el potencial al que se produzca la reacción de oxidación en el ánodo sea inferior al potencial al que tiene lugar la reacción de reducción en el cátodo. Aunque en la presente invención el ánodo cumple las funciones de sensor y el cátodo de visualizador, esta configuración no es exclusiva, y podrían darse casos en los que la reacción de detección se produce en el cátodo y la función de visualización se atribuya al ánodo. La disposición del sensor respecto al visualizador puede ser de forma que queda desplazado ligeramente en el plano XY con respecto al electrodo transparente que contiene el material electrocromico, o de forma coplanar del sensor y del electrodo transparente sobre el mismo sustrato.

35

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Muestra el esquema descriptivo del dispositivo básico y las partes que comprende.

FIG. 2 Muestra la respuesta del biosensor de glucosa (utilizando la enzima glucosa deshidrogenasa y tetrethiafulvaleno, TTF, como mediador redox) expresada como densidad de corriente normalizada con respecto al área del electrodo (3x3mm).

FIG. 3 Muestra la respuesta del electrodo de azul de Prusia electrodepositado sobre un electrodo de ITO de 3x15mm expresada como densidad de corriente normalizada con respecto al área del electrodo. La línea de trazo continuo muestra la respuesta del electrodo recién electrodepositado, mientras la línea de puntos muestra la respuesta de este mismo electrodo, 24 horas después de su electrodeposición, en una solución 0,1M KCl y 0,1M HCl. La velocidad de barrido es de 10mV s^{-1} .

FIG. 4. Muestra las imágenes del electrodo electrocrómico y cómo cambia de color de forma progresiva a medida que pasa más carga. Las líneas de puntos marcan el extremo del electrodo (izquierda) y la posición del frente de color en cada momento (derecha).

EJEMPLOS

30

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: medida de la glucosa

Se procedió a la fabricación de un dispositivo biosensor mediante técnicas de prototipado rápido, usando materiales poliméricos laminados con capas adhesivas. Dicho dispositivo contó con electrodos serigrafiados de grafito (electrodo de trabajo y auxiliar) y de plata/cloruro de plata (electrodo de pseudo-referencia), así como un
5 electrodo transparente de ITO de 3x15mm. Sobre este último, se electrodepositó una capa de azul de Prusia siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía (A. A. Karyakin and E. E. Karyakina, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, **57**, 268–273). El dispositivo se montó empleando una membrana de flujo lateral (Whatmann 1 ó Fusion 5) entre los electrodos serigrafiados y el cátodo con azul de Prusia. Para la
10 caracterización del electrodo electrocrómico, el sistema se completó empleando una disolución 0,1M KCl y 0,1M HCl. Este electrolito proporciona un medio conductor que limita las pérdidas de potencial del sistema, al tiempo que proporciona el medio ácido que estabiliza el azul de Prusia y aporta los cationes potasio necesarios para mantener la reversibilidad del proceso electrocrómico. La fabricación y montaje se detallan a
15 continuación (los elementos mencionados pueden verse en la Figura 1).

Sobre un sustrato plástico (1) se serigrafía un electrodo de carbono en su forma alotrópica de grafito, utilizando una tinta comercial (2). Sobre dicho sustrato con el electrodo impreso, se coloca un segundo material adhesivo (3) cortado de manera que
20 permite definir las áreas activas del electrodo, el contacto del electrodo, y una zona sobre la que más adelante descansará una pieza de material poroso (6). A continuación, se coloca sobre el conjunto anterior otra lámina de material adhesivo (4) sobre la que se ha impreso una banda de material conductor, en este caso cobre (5), que facilitará el contacto eléctrico entre el electrodo transparente de ITO (11) y la
25 instrumentación de caracterización empleada en el estudio (no mostrada en la figura 1). Nótese que el electrodo de contacto (5) puede imprimirse directamente sobre una capa de material única que sustituya a las capas (3) y (4). En el montaje descrito aquí se emplean dos capas de material porque dicho material tiene 130-160 micras de espesor, pero la membrana de flujo lateral (6) puede tener grosores de entre 100 y 500
30 micras. El espesor de la membrana, combinado con la concentración de sal en la solución de electrolito, permite controlar la resistencia interna del dispositivo. Tras colocar la pieza representada por (4), se procede a colocar la pieza (6). Esta pieza comprende dos partes: por un lado presenta un extremo estrecho y alargado (7), y por otro lado es más ancha (8). El lado estrecho de la tira sirve como zona de adición de la
35 muestra y también como zona de separación entre los electrodos del sistema.

Mediante la adición de disoluciones de distinta concentración salina se controla la resistencia interna del dispositivo. El lado ancho de la tira sirve como absorbente, y permite que la muestra añadida en el lado estrecho llene el sistema. Sobre este lado más ancho es posible colocar un absorbente adicional que permite el establecimiento de un flujo continuo a lo largo de la tira. En último lugar, se coloca el chip transparente (9) con el electrodo transparente (10) sobre el que se ha electrodepositado una fina capa de azul de Prusia en una zona de 3x15mm (11). Tras el montaje, el biosensor queda desplazado ligeramente en el plano XY con respecto al electrodo transparente que contiene el material electrocrómico.

10

Antes de colocar la membrana de flujo lateral (6), el electrodo de grafito se modifica para transformarlo en un biosensor de glucosa. Para ello, sobre el electrodo de carbono serigrafiado, se deposita una mezcla acuosa que contiene una enzima cuyo sustrato es la glucosa, un mediador redox, un nanomaterial de carbono, un agente entrecruzante, y una matriz polimérica. En una realización preferida, la enzima es la glucosa oxidasa, en concentraciones del orden de $1\text{-}50\text{mg mL}^{-1}$, el mediador redox puede ser un complejo de hierro, de rutenio o, en una configuración preferida, un polímero cargado con osmio con potencial de oxidación próximo a 0V vs. Ag/AgCl. En este caso, se ha empleado tetrathiafulvaleno, TTF, un compuesto redox orgánico con un potencial de oxidación-reducción cercano a los 50mV vs. Ag/AgCl. El agente entrecruzante empleado en este caso fue el glutaraldehído en una concentración del 1-1,5% en volumen, y el nanomaterial de carbono nanotubos de carbono a una concentración de 1-10mg/mL. Dicha mezcla se deposita mediante una gota que se deja secar. Dicho sensor tiene una respuesta a la concentración de glucosa del tipo mostrado en la Figura 2. Dicha figura muestra la respuesta en corriente de un biosensor como el descrito, medida a un potencial fijo tal que la oxidación del mediador no está limitada por fenómenos de transferencia de carga asociados al electrodo, sino que depende directamente de la actividad de la enzima que, a su vez, depende de la concentración de glucosa en el medio. Si se integra la corriente en un intervalo de tiempo se obtiene la carga que ha circulado por el biosensor en dicho intervalo de tiempo. La medida de carga de esta forma constituye una técnica electroquímica conocida como coulometría. La coulometría presenta una serie de ventajas frente a la amperometría, como por ejemplo una mayor sensibilidad, lo que permite medir concentraciones más pequeñas de analito que con métodos amperométricos. Además, las medidas de carga a potencial constante permiten

determinar con un alto grado de precisión la concentración de un analito presente en una muestra incluso si el coeficiente de difusión del analito en cuestión es desconocido. La carga total (a tiempo infinito) es tan sólo función de la cantidad de analito presente y del número de electrones implicados en el proceso que tiene lugar al potencial de medida, de acuerdo a la ecuación:

$$Q=nFN_O=nFVC_O^*(0) \quad \text{Eq. 1}$$

Donde Q es la carga medida en coulombios, n el número de electrones implicados, F la constante de Faraday (96485 Culombios mol⁻¹) y N_O el número de moles de O inicialmente presentes en la muestra. V es el volumen de muestra y C_O^{*} la concentración de O presente inicialmente en la muestra. A tiempos más cortos, la carga es directamente proporcional a la cantidad de analito inicial. Así, en el biosensor propuesto, la medida coulométrica tiene especial sentido ya que se pretende analizar el contenido de glucosa en un volumen de muestra muy reducido. Por ello, al ser la carga un parámetro acumulativo, se consigue amplificar la señal y mejorar la sensibilidad del dispositivo.

Por otro lado, la carga que circula por el biosensor se iguala en el electrodo opuesto mediante la reducción de un material electrocrómico depositado homogéneamente sobre la superficie de un electrodo transparente de un óxido mixto de indio y estaño (ITO, de sus siglas en inglés). Para fabricar el electrodo de ITO de la presente realización se partió de una capa de ITO de moderada conductividad (resistencia cuadro inferior a 15 ohmios) y alta transparencia, depositado mediante la técnica de depósito de vapor químico (CVD, de las siglas en inglés de "Chemical Vapour Deposition") sobre obleas de vidrio de 1mm de espesor. Dichas obleas se cortaron en dados de 20x20 mm, y posteriormente se procedió a la fabricación de los electrodos en cada uno de los chips. Los electrodos se definieron en los chips mediante grabado húmedo del material no deseado en un baño de agua regia diluida a temperatura ambiente. Se prepararon electrodos con forma rectangular de dimensiones 3x15 mm, unidos a una zona de conexión del mismo tamaño mediante una pista de 1mm de ancho. Esta pista es importante porque ayuda a controlar la resistencia interna del dispositivo.

Una vez fabricado el electrodo, se procedió al electrodeposición del material electrocrómico, que en esta realización es el azul de Prusia. El método de electrodeposición en este caso es la amperometría sin agitación forzada, en un vaso de precipitados, y polarizando el electrodo de ITO a 0,4V vs. Ag/AgCl dentro de una
5 disolución 0,1M HCl, 2mM de nitrato férrico, y 2mM de ferricianuro. El método sigue el procedimiento descrito por Karyakin en (A. A. Karyakin and E. E. Karyakina, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, **57**, 268–273). El electrodo auxiliar está diseñado de forma que la distribución de corriente durante el electrodeposición es homogénea y no resulta impedida por la presencia del electrodo de referencia. La disolución de
10 electrodeposición puede estar desoxigenada. La carga total aplicada es de entre 1 y 2 mC, y el material resultante presenta un potencial de reducción a partir de 0,25 V vs. Ag/AgCl.

Una vez electrodepositado el azul de Prusia, el electrodo se extrae de la disolución
15 rica en especies de hierro y se acondiciona, mediante voltametría cíclica, en una disolución de HCl y KCl a pH=1. El potencial se barre entre 0 y 0,5 V vs. Ag/AgCl hasta que las señales de oxidación y reducción se estabilizan (permanecen constantes). La figura 3 muestra la respuesta típica del electrodo de azul de Prusia empleado en la presente realización. Tras la estabilización del azul de Prusia, el
20 electrodo se seca al aire y se procede al montaje del sistema que incluye el biosensor descrito más arriba.

Sobre el biosensor se coloca una membrana de flujo lateral, que permitirá controlar la separación vertical entre el electrodo biosensor y el electrodo electrocrómico, así
25 como la resistencia interna del sistema cuando se introduzca una disolución de electrolito tamponador del pH, tal como una mezcla de sales de fosfato, con la muestra. Tras la colocación de esta membrana, se monta el electrodo electrocrómico, que dispone de un contacto para poder conectarse, a través de un circuito externo, al electrodo biosensor. En la presente realización, el biosensor y el electrodo
30 electrocrómico se hallan ligeramente desplazados en el plano horizontal, y separados verticalmente por la membrana. Sin embargo en otra realización preferida, ambos electrodos pudieran ser coplanares, lo que simplificaría la construcción del dispositivo. En el caso de la presente realización, el circuito externo es un potencióstato que
35 simplemente en una serie de resistencias conectadas en serie con interruptor que

permita conectar ambos electrodos cuando se desee iniciar la medida. Dichas resistencias pueden ser pistas conductoras o hilos, en función de la aplicación.

5 Cuando se añade una muestra al sistema descrito y se cierra el circuito externo, el sistema genera una fuerza electromotriz (FEM) alrededor de 250mV. Esta FEM se deriva del potencial de reducción del material electrocrómico (0,25V) y el de oxidación del mediador empleado en el electrodo biosensor (en este caso próximo a 0V). Aunque este potencial de pila es insuficiente para alimentar prácticamente ningún componente electrónico por si mismo, el cambio de color producido en el electrodo ya
10 es directamente proporcional a la concentración de analito. Gracias a la geometría del electrodo que contiene el material electrocrómico y la distribución de éste sobre el electrodo de ITO, así como a la posición relativa entre ambos electrodos, se consigue que el cambio de color se produzca a lo largo del electrodo, obteniéndose una indicación visual directa de la concentración de glucosa presente en la muestra. Por
15 otro lado, el cambio de color es una propiedad del material electrocrómico, por lo que además se dispone de toda la energía eléctrica producida por el dispositivo. Energía que, por otro lado, emplearse para alimentar otras funciones adicionales.

Ejemplo 2: Demostración del principio de funcionamiento

20 Para mostrar el principio de funcionamiento con mayor claridad se diseñó un experimento en el que se sustituye el electrodo biosensor por un electrodo inyector de corriente. Esto tiene la ventaja de que permite controlar con precisión el nivel de corriente circulante, así como la carga eléctrica que atraviesa el dispositivo. El montaje experimental es idéntico al del ejemplo 1, con la excepción de que sobre el electrodo
25 de grafito no se deposita ninguna mezcla de compuestos redox ni enzimas. En esta configuración, el electrodo de grafito se conecta al electrodo de trabajo del potencióstato, mientras que el electrodo transparente que contiene azul de Prusia se conecta a los terminales del electrodo auxiliar y el de referencia. Se hacen pasar corrientes de 10µA por el sistema, y se van tomando imágenes del dispositivo a lo
30 largo del tiempo. La figura 4 muestra 3 imágenes clave en las que se aprecia que el cambio de color se da progresivamente a lo largo del electrodo en función de la carga circulada, y no de forma homogénea en toda la superficie del mismo. El hecho de que el cambio de color se produzca de manera progresiva a lo largo del electrodo indica que la corriente circulante pasa de forma preferente por el camino de menor
35 resistencia interna en cada momento. A medida que el azul de Prusia más cercano al

electrodo de grafito se ha oxidado, cambia de color. Si continúa circulando corriente se seguirá transformando el material electrocrómico, siguiendo siempre el camino de menor resistencia a lo largo del electrodo, hasta agotarse por completo. Dado el diseño geométrico del sistema, dicha transformación se produce a lo largo del electrodo, permitiendo la cuantificación de la carga circulante de forma visual, y directa sin necesidad de electrónicas adicionales. La cantidad de azul de Prusia transformada se corresponde directamente con la carga eléctrica circulada. Por tanto, mediante el depósito controlado de material electrocrómico sobre el electrodo, es posible tener una idea de la carga por unidad de área presente en el electrodo, y por tanto el área afectada por el cambio de color puede utilizarse como un indicador directo de la concentración de analito presente en una muestra.

REIVINDICACIONES

1. Biosensor que comprende los siguientes elementos:
 - a) un primer electrodo formado por una base de un material conductor que comprende al menos un tipo de enzima inmovilizada sobre su superficie y al menos un mediador redox de la carga;
 - b) un segundo electrodo formado por un material transparente sobre el que se ha depositado un material electrocrómico;
 - c) un medio conductor de iones, situado entre ambos electrodos.
2. Biosensor según la reivindicación 1 donde el primer electrodo comprende adicionalmente grafeno o nanotubos de carbono.
3. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el mediador redox de la carga se selecciona de entre ferrocianuros, ferrocenos, complejos de osmio, complejos de rutenio, quinonas, fenotiazinas o fulvalenos.
4. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el mediador redox está incorporado a una estructura polimérica.
5. Biosensor según la reivindicación anterior donde la estructura polimérica se selecciona de entre polietileniminas, cloruros de polivinilo, polímeros basados en vinilimidazol o polímeros basados en vinilpiridina.
6. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el material electrocrómico se selecciona de entre hexacianometalatos, óxidos metálicos, complejos metalocrómicos, polímeros conjugados electrocrómicos, viológenos o porfirinas.
7. Biosensor según la reivindicación anterior donde el material electrocrómico es azul de Prusia.
8. Biosensor según la reivindicación 6 donde los polímeros conjugados electrocrómicos se seleccionan de entre polianilina, polipirrol, politiofeno, PEDOT, polycarbazol, poliazuleno o poliindol.

9. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medio conductor de iones comprende Nafion, chitosan, derivados de celulosa, polietilendiamina, gel de agar o polihema.
- 5 10. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la enzima se selecciona de entre glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, lactato oxidasa, urato oxidasa, colesterol oxidasa.
- 10 11. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el material transparente del segundo electrodo se selecciona de entre ITO, FTO, ATO, PEDOT, o nanohilos metálicos.
- 15 12. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que adicionalmente comprende un soporte permeable que se selecciona de entre un material textil no tejido o de un polímero no permeable.
13. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que adicionalmente comprende una capa adhesiva.
- 20 14. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que adicionalmente comprende una capa protectora formada por un polímero transparente.
15. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el primer electrodo funciona como ánodo y el segundo electrodo funciona como cátodo.
- 25 16. Biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde el primer electrodo funciona como cátodo y el segundo electrodo funciona como ánodo.
- 30 17. Dispositivo que comprende el biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

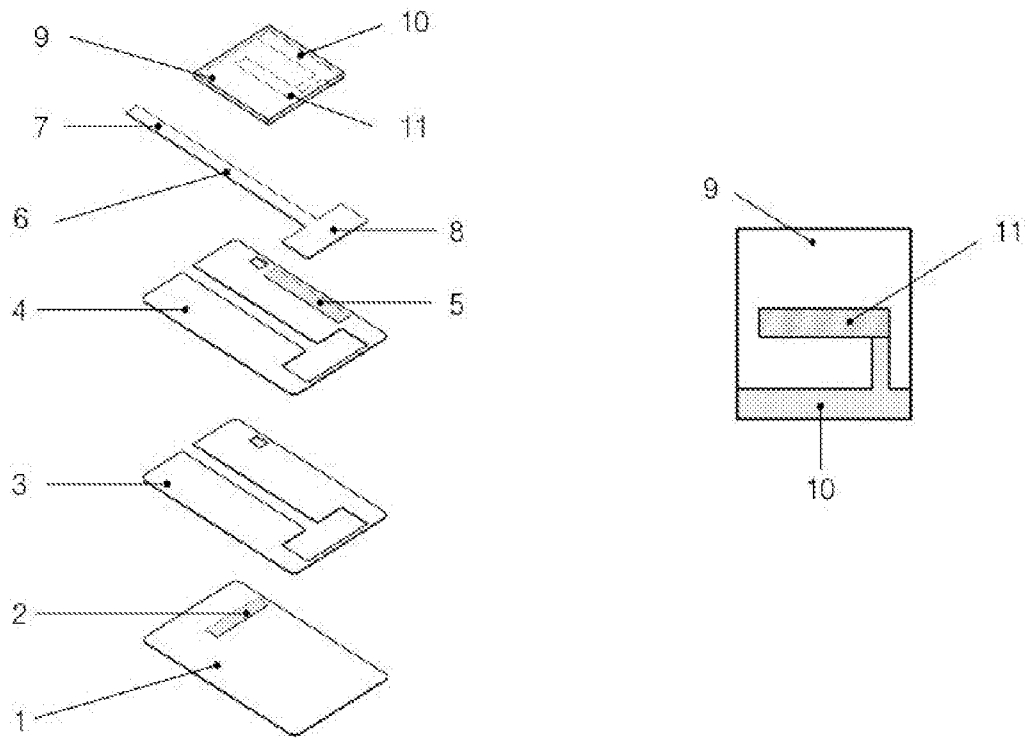


FIG. 1

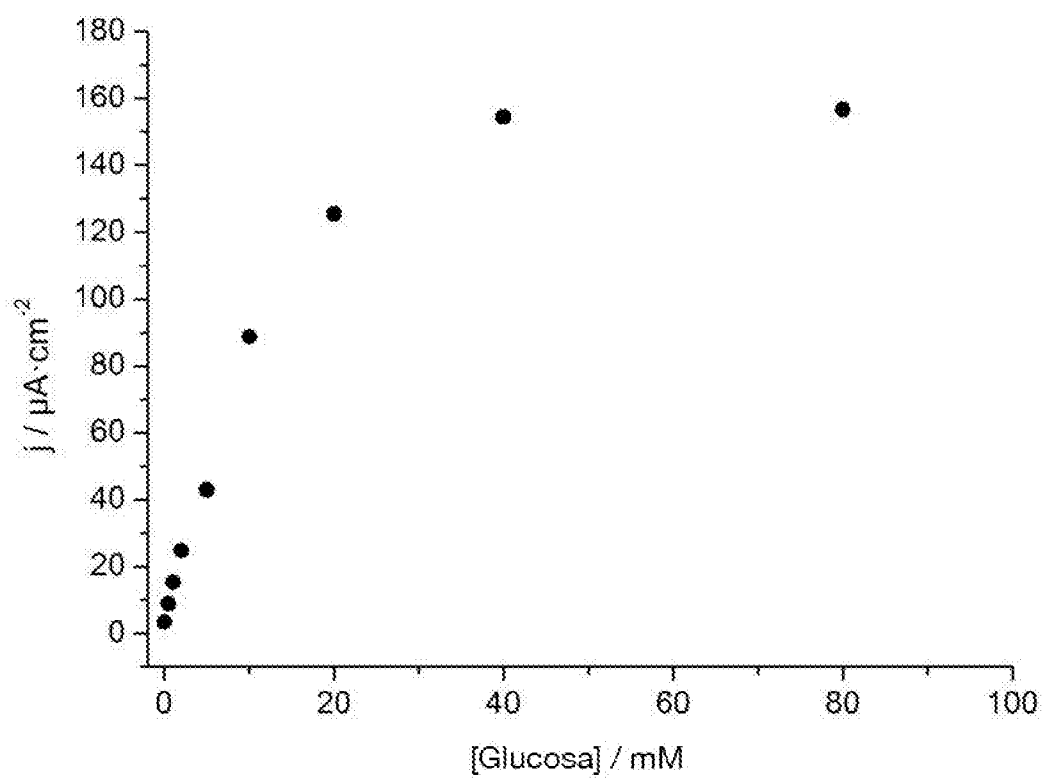


FIG. 2

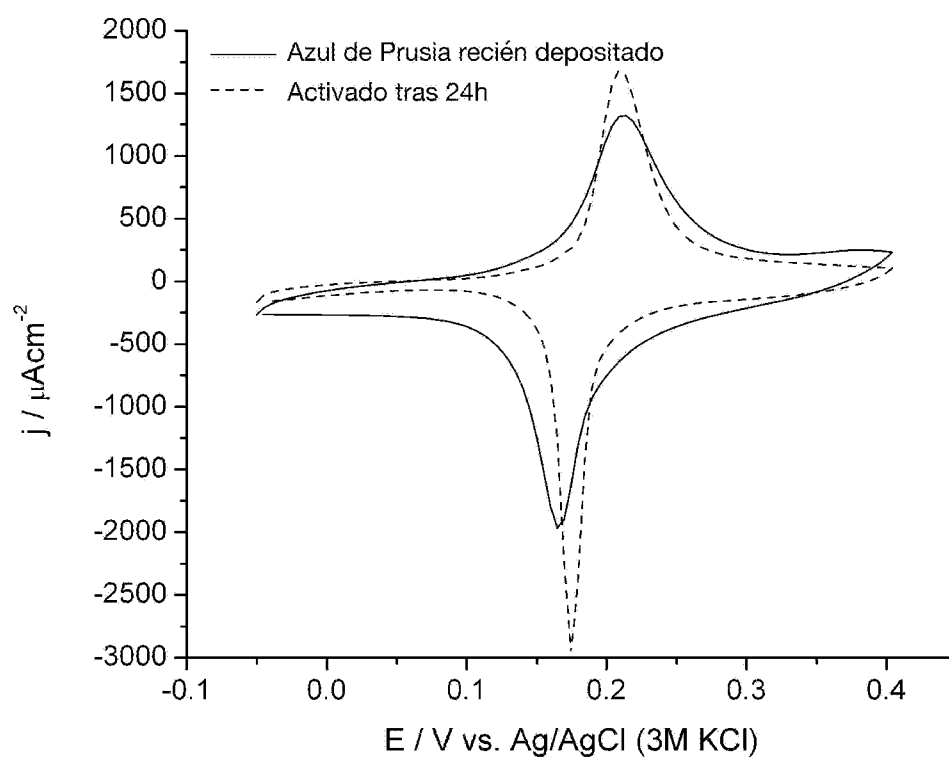


FIG. 3

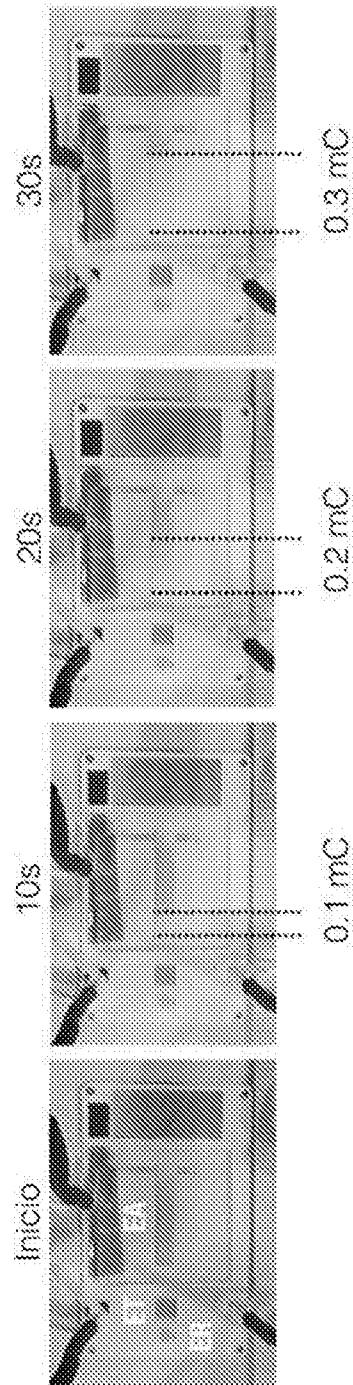


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN, TXPUS, TXPSP, TXPWEOA BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PELLITERO, M.A, GUIMERÀ, A., KITSARA, M et al. Quantitative self-powered electrochromic biosensors. Chemical science (28.11.2016), Vol 8, pages 1995-2002. DOI: 10.1039/C6SC04469G	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28/03/2017

Date of mailing of the international search report
(29/03/2017)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
A. Barrios de la Fuente

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496868

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070873

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, H., CROOKS, R. Paper-Based Electrochemical Sensing Platform with Integral Battery and Electrochromic Read-Out. Analytical Chemistry (06.03.2012), Vol 84, N° 5, pages 2528 – 2532, ISSN 0003-2700.	1-17
A	ZLOCZEWSKA, A. CELEBANSKA, A., SZOT, K. et al. Self-powered biosensor for ascorbic acid with a Prussian blue electrochromic display. Biosensors and Bioelectronics (21/11/2013)Vol 54, páginas 455-461.	1-17
A	WO 03019170 A1 (YISSUM RES DEV CO ET AL.) 06/03/2003, page 2, claims and figures	1-17
A	WO 2013130145 A2 (UNIV CALIFORNIA ET AL.) 06/09/2013, paragraphs [044],[58],[77], claims and figures	1-17
A	WANG, J., ZHANG, L., YU, L. et al. A bi-functional device for self-powered electrochromic window and self-rechargeable transparent battery applications. Nature communications. (23.09.2014),Vol 5,pages 1-7, D.O.I:10.1038/ncomms5921.	1-17
A	KONG, B, SELOMULYA, C. ZHENG, G. et al. New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications. Chem. Soc. Rev., (07.2015) Vol 44, pages 7997-8018, DOI: 10.1039/C5CS00397K	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070873

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO03019170 A1	06.03.2003	JP2009236923 A	15.10.2009
		US2004245101 A1	09.12.2004
		US7485212 B2	03.02.2009
		JP2005501253 A	13.01.2005
		IL145182 A	20.11.2005
		EP1421370 A1	26.05.2004
-----	-----	-----	-----
WO2013130145 A2	06.09.2013	US2014322617 A1	30.10.2014
		US9502730 B2	22.11.2016
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070873

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/26 (2006.01)

C12Q1/00 (2006.01)

G01N27/403 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070873

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN, TXPUS, TXPSP, TXPWEOA BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	PELLITERO, M.A, GUIMERÀ, A., KITSARA, M et al. Quantitative self-powered electrochromic biosensors. Chemical science (28.11.2016), Vol 8, páginas 1995-2002. DOI: 10.1039/C6SC04469G	1-17

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
28/03/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29 de marzo de 2017 (29/03/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Barrios de la Fuente

Nº de teléfono 91 3496868

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/070873

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	LIU, H., CROOKS, R. Paper-Based Electrochemical Sensing Platform with Integral Battery and Electrochromic Read-Out. Analytical Chemistry (06.03.2012), Vol 84, N° 5, páginas 2528 – 2532, ISSN 0003-2700.	1-17
A	ZLOCZEWSKA, A. CELEBANSKA, A., SZOT, K. et al. Self-powered biosensor for ascorbic acid with a Prussian blue electrochromic display. Biosensors and Bioelectronics (21/11/2013) Vol 54, páginas 455-461.	1-17
A	WO 03019170 A1 (YISSUM RES DEV CO ET AL.) 06/03/2003, página 2, reivindicaciones y figuras	1-17
A	WO 2013130145 A2 (UNIV CALIFORNIA ET AL.) 06/09/2013, párrafos [044],[58],[77], reivindicaciones y figuras	1-17
A	WANG, J., ZHANG, L., YU, L. et al. A bi-functional device for self-powered electrochromic window and self-rechargeable transparent battery applications. Nature communications. (23.09.2014), Vol 5, páginas 1-7, D.O.I:10.1038/ncomms5921.	1-17
A	KONG, B, SELOMULYA, C. ZHENG, G. et al. New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications. Chem. Soc. Rev., (07.2015) Vol 44, páginas 7997-8018, DOI: 10.1039/C5CS00397K	1-17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070873

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO03019170 A1	06.03.2003	JP2009236923 A US2004245101 A1 US7485212 B2 JP2005501253 A IL145182 A EP1421370 A1	15.10.2009 09.12.2004 03.02.2009 13.01.2005 20.11.2005 26.05.2004
----- WO2013130145 A2 -----	----- 06.09.2013 -----	----- US2014322617 A1 US9502730 B2 -----	----- 30.10.2014 22.11.2016 -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12Q1/26 (2006.01)

C12Q1/00 (2006.01)

G01N27/403 (2006.01)