



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 615**

21 Número de solicitud: 200931164

51 Int. Cl.:

**G01N 27/02** (2006.01)

**G01N 27/07** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/538** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **15.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**07.11.2011**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Ramón Azcón, Javier;**  
**Sánchez Baeza, Francisco José;**  
**Marco Colas, María Pilar;**  
**Bratov Nikíforov, Andrei;**  
**Abramova, Natalia y**  
**Ipatov, Andrey**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Sistema y procedimiento multianalítico basado en mediciones impedimétricas.**

57 Resumen:

Sistema y procedimiento multianalítico basado en mediciones impedimétricas.

La invención describe un sistema para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una muestra o bien para la detección y/o cuantificación simultánea de un analito en varias muestras, que comprende: un chip (10) multielectrodo que comprende un conjunto de microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d); una celda (20) de conducto único, que comprende una ranura (21) que aloja el chip (10) multielectrodo y un conducto (22) por el que una muestra fluida puede circular secuencialmente por cada uno de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) de un chip (10) multielectrodo cuando éste está alojado en la ranura (21); y una celda (30) de conductos múltiples, que comprende una ranura (31) que aloja el chip (10) multielectrodo y varios conductos (32a, 32b, 32c, 32d) independientes por los que varias muestras pueden circular independientemente por cada electrodo (11a, 11b, 11c, 11d) del chip (10) multielectrodo.

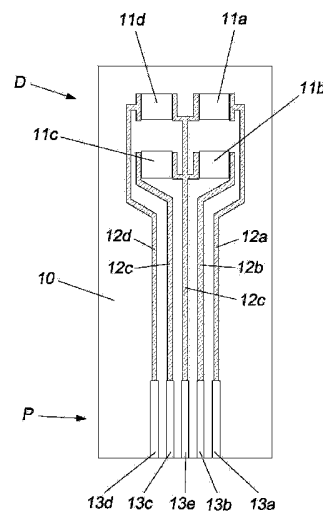


FIG. 1

ES 2 367 615 A1

**DESCRIPCIÓN**

Sistema y procedimiento multianalítico basado en mediciones impedimétricas.

**5 Objeto de la invención**

El objeto principal de la invención es un sistema y procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra o bien para la detección y/o cuantificación simultánea de un único analito en varias muestras.

10

**Antecedentes de la invención**

Es conocido que las medidas de impedancia permiten detectar variaciones extremadamente pequeñas en las propiedades y composición química de los electrodos utilizados para realizar la medición así como de la superficie de los mismos y del medio entre ellos. Este hecho ha permitido registrar fenómenos como la formación de un complejo antígeno anticuerpo en la superficie del electrodo (Bataillard, P. *et al.*, Anal. Chem., 1988, 60, 2374). Los primeros sistemas eran incapaces de detectar compuestos minoritarios y menos aún a nivel de trazas en las muestras a analizar. Para aumentar la sensibilidad de la técnica y además poder miniaturizar los dispositivos, se desarrollaron los transductores basados en electrodos interdigitados (P. van Gerwen *et al.*, Sens. Actua. B, 1998, 49, 73). La utilización de estos tipos de electrodos como sensores químicos mediante medidas impedimétricas ha sido recogida en patentes con diversas concepciones (WO2004044570) y en esencia se basan en inmovilizar el compuesto que juega el papel de receptor en la superficie del electrodo y ponerlo en contacto con la muestra a analizar. Si existe el compuesto complementario este se unirá al receptor modificando la naturaleza de la capa superficial del transductor y modificando la impedancia de la misma. La magnitud del cambio es proporcional a la cantidad de compuesto que se ha unido al transductor la cual a su vez depende de la cantidad del mismo presente en la muestra. La correlación se puede realizar con el valor de la impedancia a una o varias frecuencias de interrogación o mediante el ajuste de la respuesta en función de la frecuencia a un circuito equivalente y correlacionar el valor de uno o varios de los componentes con la concentración del analito.

A pesar de las mejoras anteriores los sistemas aún no tenían la sensibilidad requerida para la detección y cuantificación de compuestos a nivel de trazas y menos aún si se trataba de compuestos de bajo peso molecular (menos de 1000 Dalton). Una mejora importante en el diseño de los transductores fue el desarrollo de los electrodos interdigitados con barreras aislantes entre los elementos conductores con una altura del orden de la separación de los electrodos recogida en la patente ES2307430. Con este dispositivo transductor se puede detectar compuestos de bajo peso molecular con una sensibilidad similar a la de los ensayos de tipo ELISA que utilizan el mismo juego de inmunoreactivos.

Junto a los precedentes en tecnología de sensores impedimétricos hay que añadir los precedentes en técnicas inmunoquímicas de análisis de tipo multianalito. En general los métodos multianalito se realizan por separación en el espacio de cada inmunoensayo elemental de forma que el sistema multianalito no pasa de ser un sistema de n-ensayos para n analitos diferentes. Este sistema no explota la extremada selectividad que muestran los anticuerpos por sus substratos (similar a la de los enzimas por los suyos). Una mejora al sistema convencional y que de alguna manera recuerda a como funciona el sistema inmune es utilizar un coctel con los anticuerpos que van a reconocer los diferentes analitos ya que no van a haber reacciones cruzadas entre ellos. Esta estrategia es la que se recoge en el trabajo sobre un ensayo ELISA multianalito para la detección de diversas familias de antibióticos en leche (Adrian J. *et al.*, Anal and Bioanal Chem., 2008, 391, 1703). Dado que se trataba de moléculas de bajo peso molecular se requería un ensayo de tipo competitivo donde se había inmovilizado de forma separada en la placa de pocillos el competidor apropiado para cada analito lo que permitía obtener de forma separada las señales para cada uno a pesar de utilizar una mezcla de anticuerpos sobre la muestra. Este trabajo demuestra la posibilidad de trabajar con mezclas de anticuerpos sin que la señal no específica sea mayor que en los ensayos individuales y sin que haya interferencia entre la respuesta para los diferentes analitos.

**Descripción de la invención**

El objetivo de la presente invención es un sistema de análisis capaz de detectar simultáneamente la presencia de un único analito en varias muestras, o bien de detectar simultáneamente la presencia de varios analitos en una única muestra. Para ello se describe un sistema biosensor multianalito o multimuestra de alta sensibilidad basado en un array de electrodos interdigitados con barreras, un sistema de flujo que combina dos tipos de cámaras de muestra (una multicelda y otra de celda única) y un inmunoensayo multianalito por mezcla de anticuerpos específicos.

El término "analito" tal como se entiende en la presente invención es el componente que se pretende detectar y/o cuantificar en una muestra. En este sentido, el analito puede ser un elemento, un compuesto o un ión, es decir, una especie química que puede ser detectada y/o cuantificada. Un compuesto es una sustancia formada por la unión de 2 o más elementos de la tabla periódica, en una razón fija. Un compuesto está formado por moléculas o iones con enlaces estables.

Asimismo el analito/s de interés en una muestra puede ser de naturaleza inorgánica, orgánica o bioquímica. El analito puede tener naturaleza biológica y por tanto, podría comprender cualquier molécula de origen biológico o cualquier tipo de célula, orgánulo celular o cualquier parte de éstos. En este sentido el término "molécula de origen

## ES 2 367 615 A1

biológico” comprende, pero sin limitarse, bioelementos (elementos químicos que aparecen en los seres vivos), ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, enzimas, glúcidos, lípidos, vitaminas, anticuerpos u hormonas.

El analito de la presente invención puede detectarse o cuantificarse de forma indirecta a través de la detección o cuantificación de un anticuerpo capaz de reconocer al analito de forma específica. Esto sería en el caso de que la muestra proceda de un organismo cuyo sistema inmunológico pueda generar anticuerpos específicos que reconozcan a dicho antígeno.

El analito de la presente invención puede estar presente:

- En una muestra alimentaria (residuos de fármacos veterinarios en productos de origen animal, residuos de pesticidas en productos vegetales o contaminación microbiológica).
- En una muestra de origen biológico, más concretamente de origen clínico.
- En una muestra procedente de cualquier compartimento medioambiental (compuestos orgánicos de origen antropogénico; restos de fármacos, pesticidas o productos industriales).

Un primer aspecto de la invención describe un sistema analítico impedimétrico múltiple que comprende un chip multielectrodo, una celda de conducto único y una segunda celda de conductos múltiples. A continuación se describe cada uno de estos elementos.

### a) *Chip multielectrodo*

Se trata de un chip que comprende un conjunto de microelectrodos cuya impedancia cambia cuando se pone en contacto con una muestra en la que esta presente un analito particular. Así, a partir del cambio en la impedancia de un microelectrodo, se puede calcular la cantidad de analito presente en la muestra.

Con el objeto de describir el chip multielectrodo de la invención, en el presente documento el término “extremo distal” hace referencia al extremo sobre el cual están situados los microelectrodos, y que se introduce en la ranura de la celda correspondiente, mientras que el “extremo proximal” del chip multielectrodo es el extremo opuesto, que queda fuera de la ranura.

En una realización preferida de la invención, los microelectrodos del extremo distal del chip multielectrodo están unidos eléctricamente, mediante unas pistas conductoras, con unos conectores situados en el extremo proximal. Tanto los microelectrodos como las pistas conductoras se fabrican empleando un material de alta conductividad, preferiblemente TaSi<sub>2</sub>. Además, unas barreras dieléctricas entre los microelectrodos aseguran evitan cortocircuitos entre ellos, mientras que las pistas, a su vez, están recubiertas por un material dieléctrico de protección. En realizaciones preferidas de la invención, tanto las barreras dieléctricas como el recubrimiento de las pistas están hechos de SiO<sub>2</sub>.

En una realización preferida de la invención, el chip multielectrodo se conecta, por medio de los conectores situados en su extremo proximal, a un dispositivo de excitación y procesamiento. La primera función de dicho dispositivo de excitación y procesamiento es provocar el paso de una intensidad por los microelectrodos, normalmente aplicando una diferencia de tensión entre sus terminales. Así, conociendo la diferencia de tensión aplicada a cada microelectrodo, la intensidad que lo atraviese será función de su impedancia, la cual, a su vez, es dependiente de la cantidad de analito presente en la muestra y que ha provocado la modificación química del microelectrodo. Por tanto, la segunda función del medio de excitación y procesamiento es procesar la señal de intensidad obtenida para determinar la impedancia de cada electrodo, deduciendo del cambio de dicho valor la cantidad de analito presente en la muestra de acuerdo con el procedimiento que se describirá más adelante en el presente documento.

### b) *Celda de conducto único*

Se trata de una celda que comprende una ranura adecuada para alojar el chip multielectrodo y un único conducto por el que una muestra fluida puede circular secuencialmente por cada microelectrodo del chip multielectrodo cuando éste se encuentra alojado en la ranura. Preferiblemente, los orificios de entrada y salida del conducto de circulación están situados en la cara superior de la celda de conducto único. En resumen, esta celda hace pasar la muestra por todos los electrodos del chip multielectrodo.

Se ha empleado el término “ranura” para describir el orificio por el cual se introduce el chip multielectrodo de la invención debido a que, en una realización particular, el chip multielectrodo tiene forma plana y alargada. Sin embargo, la presente invención no pretende ser limitante con relación a la forma del chip multielectrodo, y por lo tanto tampoco con relación a la forma de la ranura, que podría así tener cualquier forma siempre que estuviese adaptada para recibir el chip multielectrodo.

### c) *Celda de conductos múltiples*

Esta celda comprende una ranura adecuada para alojar el chip multielectrodo y varios conductos por los que una muestra fluida puede circular de manera independiente por cada microelectrodo del chip multielectrodo. Al igual que

## ES 2 367 615 A1

en el caso de la celda de conducto único, los orificios de entrada y salida de los conductos están preferentemente situados en la cara superior de dicha celda de conductos múltiples. En resumen, conducir la celda de conductos múltiples permite hacer pasar muestras diferentes por cada microelectrodo sin que se mezclen entre ellos.

5 En realizaciones preferidas de la invención, cada una de las celdas anteriores está fijada entre dos láminas de soporte, formando una estructura tipo “sándwich” donde las láminas y la celda están unidas mediante tornillos o mediante cualquier otro sistema que impida la fuga del fluido fuera de las cámaras y su mezcla incontrolada.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se describe también un procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra, empleando el sistema analítico impedimétrico múltiple descrito, que comprende las siguientes operaciones:

1) Introducir el chip multielectrodo en la ranura de la celda de conductos múltiples.

15 2) Hacer fluir por cada uno de los conductos un compuesto adecuado para conseguir la fijación sobre cada microelectrodo de un receptor o competidor selectivo para cada analito que se desea detectar.

3) Extraer el chip multielectrodo de la celda de conductos múltiples e introducirlo en la celda de conducto único. Después de su extracción, el chip multielectrodo se puede conservar por un tiempo en las condiciones adecuadas o puede ser utilizado inmediatamente.

4) Hacer fluir la muestra mezclada con un cocktail de inmunoreactivos apropiado a cada conjunto de analitos a determinar por el conducto de la celda de conducto único, quedando fijado cada uno de los analitos (o el anticuerpo específico) deseados al microelectrodo activado correspondiente.

25 En una realización preferente de la invención, se emplea la diferencia de la impedancia de cada microelectrodo antes y después del paso de la muestra para calcular la concentración de analito.

30 Así, antes del paso de la muestra por los microelectrodos, se realiza una primera medición de la conductividad de los mismos.

Una vez la muestra ha pasado secuencialmente por los electrodos, quedando fijado un analito (o su anticuerpo) a cada microelectrodo, se hace pasar una solución de lavado por el conducto de la celda de conducto único y, a continuación, se realiza una segunda medición de la conductividad de los microelectrodos. La diferencia de conductividad detectada es procesada en el dispositivo de excitación y procesamiento para determinar la concentración de cada analito en la muestra.

40 Finalmente, de acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se describe un procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de un único analito en varias muestras mediante el sistema analítico impedimétrico múltiple. Este procedimiento comprende las siguientes operaciones:

1) Introducir el chip multielectrodo en la ranura de la celda de conducto único.

45 2) Hacer fluir por el único conducto un compuesto adecuado para conseguir la fijación sobre cada electrodo detector de un receptor o competidor selectivo para el analito que se desea detectar.

3) Extraer el microchip multielectrodo de la celda de conducto único e introducirlo en la celda de conductos múltiples. Después de su extracción, el chip multielectrodo se puede conservar por un tiempo en las condiciones adecuadas o puede ser utilizado inmediatamente.

4) Hacer fluir una muestra (mezclada si es necesario con el inmunoreactivo correspondiente) por cada conducto de la celda de conductos múltiples, quedando fijado el analito (o el anticuerpo complementario) deseado a cada microelectrodo.

55 En una realización preferente de la invención, se emplea el cambio de la impedancia de cada electrodo antes y después del paso de las muestras para calcular la concentración de analito en cada una de las muestras.

60 Así, antes del paso de las muestras por los microelectrodos, se realiza una primera medición de la impedancia de los mismos.

Una vez se han hecho pasar las muestras por los microelectrodos, quedando fijado el analito a cada microelectrodo, se hace pasar una solución de lavado por cada uno de los conductos de dicha celda de conductos múltiples y, a continuación, se realiza una segunda medición de la impedancia de los microelectrodos. La diferencia de impedancia detectada es procesada para determinar el cambio en la concentración del analito en cada muestra.

65

## Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Fig. 1.- Muestra una vista en planta de un chip multielectrodo de acuerdo con la presente invención.

Figs 2a y 2b.- Muestra sendas vistas de planta y alzado del chip multielectrodo de la invención insertado en la ranura de una celda de conducto único.

Figs 3a y 3b.- Muestra sendas vistas de planta y alzado del chip multielectrodo (en concreto el modelo de cuatro electrodos) de la invención insertado en la ranura de una celda de conductos múltiples.

Fig 4.- Muestra el circuito equivalente utilizado para el ajuste de los valores experimentales de impedancia.

Fig. 5.- Muestra las curvas de calibración realizadas con los inmunoreactivos correspondientes a cada analito y con la disolución "cóctel" que contiene todos los anticuerpos de cada uno de los analitos utilizados en el ejemplo de la presente invención.

## Realización preferente de la invención

Se describe a continuación un ejemplo de un sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con la presente invención, haciendo referencia a las figuras adjuntas. En particular, se trata de un sistema analítico adecuado para la realización de cuatro ensayos en paralelo ya sea para determinar cuatro compuestos diferentes en una misma muestra o el mismo compuesto en cuatro muestras diferentes.

La Fig. 1 muestra un chip tetraelectrodo (10), en cuyo extremo distal (D) se han representado cuatro microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) que están unidos eléctricamente, por medio de cuatro pistas conductoras (12a, 12b, 12c, 12d, 12e), con unos conectores (13a, 13b, 13c, 13d, 13e) metálicos situados en el extremo proximal (P). En este ejemplo, los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) están fabricados en siliciuro de tantalio ( $\text{TaSi}_2$ ), y se han fabricado unas barreras dieléctricas (no mostradas en las figuras) entre ellos para minimizar el riesgo de que se produzcan cortocircuitos.

Además, se aprecia cómo los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) tienen un terminal común unido al conector (13e), que sirve como referencia al aplicar la tensión necesaria para la medición de la impedancia de cada uno de ellos.

En las Fig. 2a y 2b se puede observar el chip tetraelectrodo (10) insertado en la ranura (21) de la celda (20) de conducto único. En este ejemplo, el conducto (22) tiene un orificio de entrada situado en la cara superior de la celda (20), extendiéndose verticalmente hacia abajo hasta el primero de los microelectrodos (11a) y pasando a continuación secuencialmente, en la dirección que indican las flechas, por el microelectrodo (11b), por el microelectrodo (11c) y por el microelectrodo (11d). Finalmente, el conducto (22) vuelve a extenderse verticalmente hacia arriba hasta el orificio de salida. De este modo, en una misma operación se puede hacer circular un mismo fluido por los cuatro microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d).

También se aprecia en la Fig. 2a cómo la celda (20) de conducto único está encerrada entre dos láminas de soporte (23, 24) y fijada entre ellas mediante tornillos (25) y tuercas (26).

Las Fig. 3a y 3b muestran el chip tetraelectrodo (10) insertado en la ranura (31) de la segunda celda (30) de conductos múltiples. En este caso, se aprecia cómo hay cuatro conductos (32a, 32b, 32c, 32d) independientes, cada uno de los cuales desciende en vertical desde sus respectivos orificios de entrada hasta cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d), ascendiendo a continuación hasta sus orificios de salida. Así, se puede hacer circular simultáneamente cuatro fluidos diferentes, cada uno por uno de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d).

La segunda celda (30) también está fijada entre dos láminas de soporte (33, 34) mediante tornillos (35) y tuercas (36).

## Ejemplo

En un primer ejemplo, se desea la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra empleando el sistema de la invención. En particular, se desea saber si una muestra alimentaria esta contaminada por los pesticidas atrazina (ATRZ), azimfós (AZM), triclorofenol (TCP) o bromopropilato (BP) y a los que llamaremos los analitos problema.

Para ello, en primer lugar, se introdujo (paso 1) el chip tetraelectrodo (10) en la ranura (31) de una celda (30) de conductos múltiples y se hizo pasar por cada conducto (32a, 32b, 32c, 32d) una solución de lavado y activación de la superficie de los electrodos. A continuación se procede a la fase de tapizado que supone pasar un antígeno específico

## ES 2 367 615 A1

para cada analito (AT1, AT2, AT3 y AT4), con el objeto de inmovilizarlos (paso 2) selectivamente en la superficie de cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

La inmovilización de compuestos en la superficie de un soporte como uno de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) de esta invención, es dirigido por la química de la superficie. Hay muchos factores que pueden modificar la capacidad de inmovilización de los compuestos. El tiempo y la temperatura de incubación son muy importantes. Generalmente a mayor temperatura menos tiempo de incubación es necesario pero es preferible utilizar una temperatura de entre 3 y 6°C durante un tiempo de entre 10 y 20 horas para inmovilizar los compuestos a la superficie del soporte sólido.

El paso de inmovilización de un antígeno incluye un último paso de bloqueo de los espacios del soporte que no hayan sido ocupados por los antígenos ya que la unión al mismo no es selectiva y de no llevarse a cabo el bloqueo se podrían unir otras moléculas no específicas. El bloqueo se llevó a cabo mediante proteínas o detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos. Más preferiblemente se emplea PBST.

El PBS es tampón fosfato de 10 mM, con solución salina del 0.8%, y siempre que no se indique lo contrario el pH es de 7.5. El PBST es PBS con Tween 20 al 0.05%. El tampón de tapizado es carbonato-bicarbonato 0.05 M, de pH 9.6.

A continuación, se hace pasar por cada conducto (32a, 32b, 32c, 32d) una solución de lavado PBST para eliminar aquellos antígenos que no habían sido fijados al microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

A continuación, se extrajo el chip (10) multielectrodo de la ranura (31) de la celda (30) de conductos múltiples. Este electrodo activado y funcionalizado puede guardarse en frío y en atmósfera inerte para una utilización posterior. Puede considerarse que hasta aquí es la fase de construcción y preparación del sensor.

Para la etapa de medición, se introdujo el correspondiente chip activado y funcionalizado en la ranura (21) de la celda (20) de conducto único (paso 3). Se hizo fluir la mezcla de la muestra con los anticuerpos anti-antígeno (Ac1, Ac2, Ac3 y Ac4) para los cuatro analitos a detectar, preincubados durante un tiempo determinado, por el conducto (22) de la celda (20) de conducto único (paso 4). La fracción de anticuerpos que no ha reaccionado con el analito presente en la muestra quedará fijada en el microelectrodo funcionalizado con el antígeno correspondiente (11a, 11b, 11c, 11d).

La preincubación consistió en mezclar la muestra y anticuerpos anti-antígeno durante un tiempo determinado, preferiblemente menos de 30 minutos, a una temperatura de entre 15 y 30°C. La mezcla preincubada se pasó por los antígenos inmovilizados en los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) y se incubó en las mismas condiciones que la preincubación durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos. De esta manera se consiguió la unión de los anticuerpos libres que puedan quedar en la muestra a los antígenos inmovilizados en el soporte.

El siguiente paso fue el lavado de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) para eliminar todas aquellas sustancias que no se hayan unido específicamente a los antígenos inmovilizados del modo que ha sido descrito.

A continuación, se hizo pasar por cada conducto (32a, 32b, 32c, 32d) una solución de medida de forma que queden sumergidos los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d). La solución de medida es una solución de KCl  $1 \times 10^{-6}$  M, con una conductividad de  $1.6 \mu\text{Scm}^{-1}$ . Se tomaron las medidas de impedancia en el intervalo de frecuencias entre 100 KHz y 10 Hz. Los datos de impedancia obtenidos se ajustaron mediante el programa comercial: Zplot/Zview (Scribner Associates Inc), al circuito equivalente presentado en la Fig. 4.

Las medidas de impedancia fueron comparadas con las medidas de impedancia del control para determinar la concentración de analito de la muestra.

El control es un grupo de soluciones que contiene el analito, que se desea detectar y/o cuantificar en la presente invención, a concentraciones conocidas, de modo que los valores de impedancia y los valores de concentración mantienen una relación conocida en un rango determinado permitiendo crear una curva de calibrado o de regresión lineal (Fig. 5). Las concentraciones del compuesto presente en la muestra son cuantificadas interpolando los valores obtenidos en la medición preferentemente en zona lineal de la curva de calibrado o recta de regresión lineal.

# ES 2 367 615 A1

TABLA 1

*Intervalo de concentraciones utilizadas para la elaboración de las curvas de calibrado*

Ensayo	Intervalo de las curvas de calibrado ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )
Atrazina	500-1.6 $\times 10^{-3}$
TCP	200-3 $\times 10^{-3}$
Bromopropilato	250-4 $\times 10^{-3}$
Azinfós	300-3.84 $\times 10^{-3}$

Además, se realizó una primera medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) previamente al paso de las muestras por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) utilizando solamente el tampón de detección. Esta medida es la medida de referencia que será restada a las medidas que se obtengan en la segunda medición para determinar la medida real de la variación de impedancia debida únicamente a la presencia del analito. La segunda medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) se llevó a cabo después del paso de las muestras por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) y de una etapa posterior de lavado tal como se ha descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

5 1. Sistema multianalítico múltiple basado en muestras impedimétricas para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra o para la detección simultánea de un analito en varias muestras, **caracterizado** porque comprende:

- un chip (10) multielectrodo que comprende un conjunto de microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d);

10 - una celda (20) de conducto único, que comprende una ranura (21) adecuada para alojar el chip (10) multielectrodo y un único conducto (22) por el que una muestra fluida puede circular secuencialmente por cada uno de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) de un chip (10) multielectrodo cuando éste está alojado en la ranura (21);

15 - una segunda celda (30) de conductos múltiples, que comprende una ranura (31) adecuada para alojar el chip (10) multielectrodo y varios conductos (32a, 32b, 32c, 32d) independientes por los que varias muestras fluidas pueden circular de manera independiente por cada electrodo (11a, 11b, 11c, 11d) del chip (10) multielectrodo.

20 2. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque además comprende un dispositivo de excitación y procesamiento conectado al chip (10) multielectrodo.

25 3. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque los electrodos (11a, 11b, 11c, 11d), situados en un extremo distal (D) del chip (10) multielectrodo, están conectados eléctricamente mediante unas pistas (12a, 12b, 12c, 12d, 12e) con unos conectores (13a, 13b, 13c, 13d, 13e), situados en un extremo proximal (P), que permiten la conexión de dicho chip (10) multielectrodo con el dispositivo de excitación y procesamiento.

30 4. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) y las pistas (12a, 12b, 12c, 12d, 12e) están hechos de TaSi<sub>2</sub>.

35 5. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-4, **caracterizado** porque además comprende unas barreras dieléctricas que separan los electrodos (11a, 11b, 11c, 11d) unos de otros.

6. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, **caracterizado** porque además comprende un recubrimiento dieléctrico para la protección de las pistas (12a, 12b, 12c, 12d, 12e).

7. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque las barreras dieléctricas y el recubrimiento dieléctrico están hechos de SiO<sub>2</sub>.

40 8. Sistema analítico impedimétrico múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque cada celda (20, 30) está fijada a dos láminas (23, 24, 33, 34) de soporte, formando una estructura tipo "sándwich".

45 9. Procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra mediante el sistema analítico impedimétrico múltiple de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones:

- introducir el chip (10) multielectrodo en la ranura (31) de la celda (30) de conductos múltiples;

50 - hacer fluir por cada uno de los conductos (32a, 32b, 32c, 32d) un compuesto adecuado para conseguir la fijación sobre cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d) de un receptor o competidor selectivo para cada analito que se desea detectar;

55 - extraer el chip (10) multielectrodo de la celda (30) de conductos múltiples e introducirlo en la ranura (21) de la celda (20) de conducto único; y

- hacer fluir la única muestra mezclada con un cocktail de inmunoreactivos apropiado a cada analito por el conducto (22) de la celda (20) de conducto único, quedando fijado cada uno de los analitos deseados al correspondiente microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

60 10. Procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque además comprende las siguientes operaciones:

65 - realizar una primera medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) con anterioridad al paso de la muestra por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d);



## ES 2 367 615 A1

- realizar una segunda medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) después del paso de la muestra por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) y de una etapa posterior de lavado; y

5 - determinar, a partir de las dos mediciones anteriores, la cantidad de cada analito en cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

10 11. Procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de un único analito en varias muestras mediante el sistema analítico impedimétrico múltiple de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones:

- introducir el chip (10) multielectrodo en la ranura (21) de la celda (20) de conducto único;

15 - hacer fluir por el conducto (22) un compuesto adecuado para conseguir la fijación sobre cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d) de un receptor o competidor selectivo para el analito que se desea detectar;

- extraer el chip (10) multielectrodo de la celda (20) de conducto único e introducirlo en la ranura (31) de la celda (30) de conductos múltiples; y

20 - hacer fluir una muestra por cada conducto (32a, 32b, 32c, 32d) de la celda (30) de conductos múltiples, quedando fijado el analito deseado a cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

25 12. Procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de un único analito en varias muestras de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** porque además comprende las siguientes operaciones:

- realizar una primera medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) previamente al paso de las muestras por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d);

30 - realizar una segunda medición de la conductividad de los microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) después del paso de las muestras por dichos microelectrodos (11a, 11b, 11c, 11d) y de una etapa posterior de lavado; y

35 - determinar, a partir de las dos mediciones anteriores, la cantidad del analito en cada microelectrodo (11a, 11b, 11c, 11d).

40

45

50

55

60

65

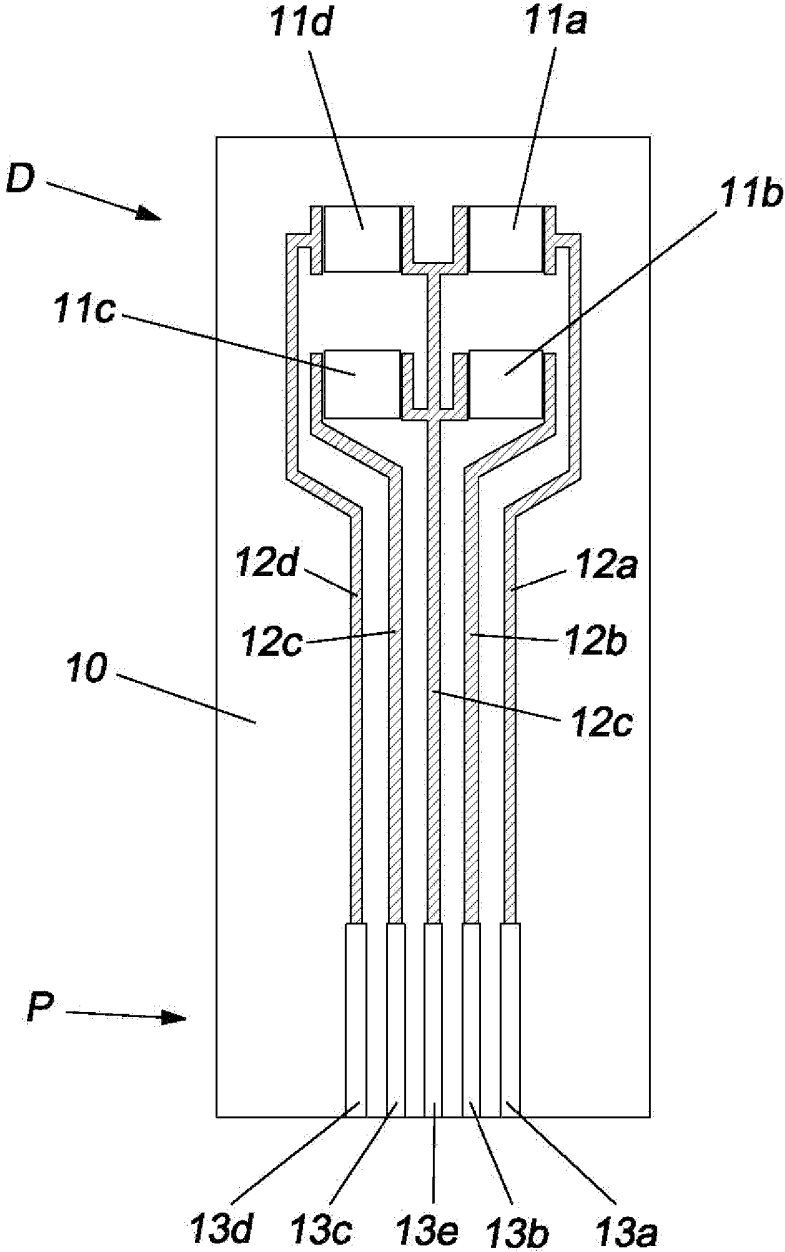


FIG. 1

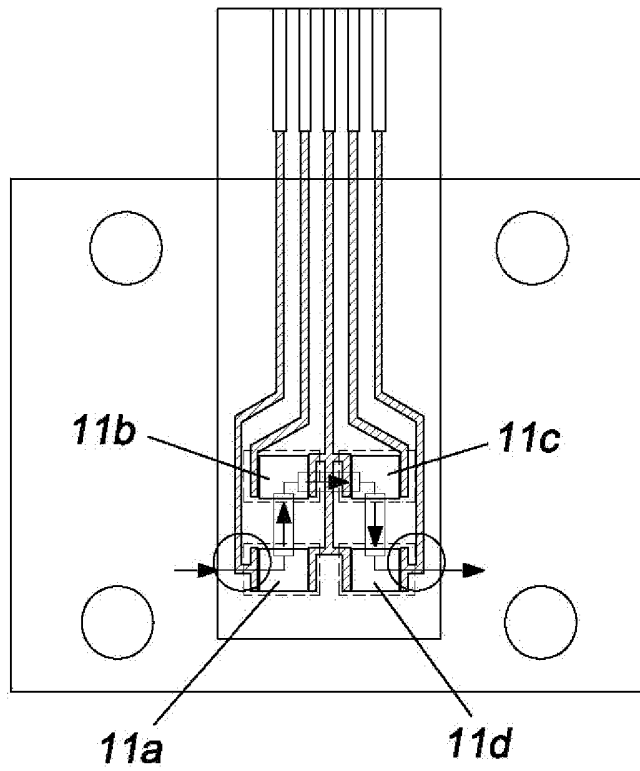


FIG. 2a

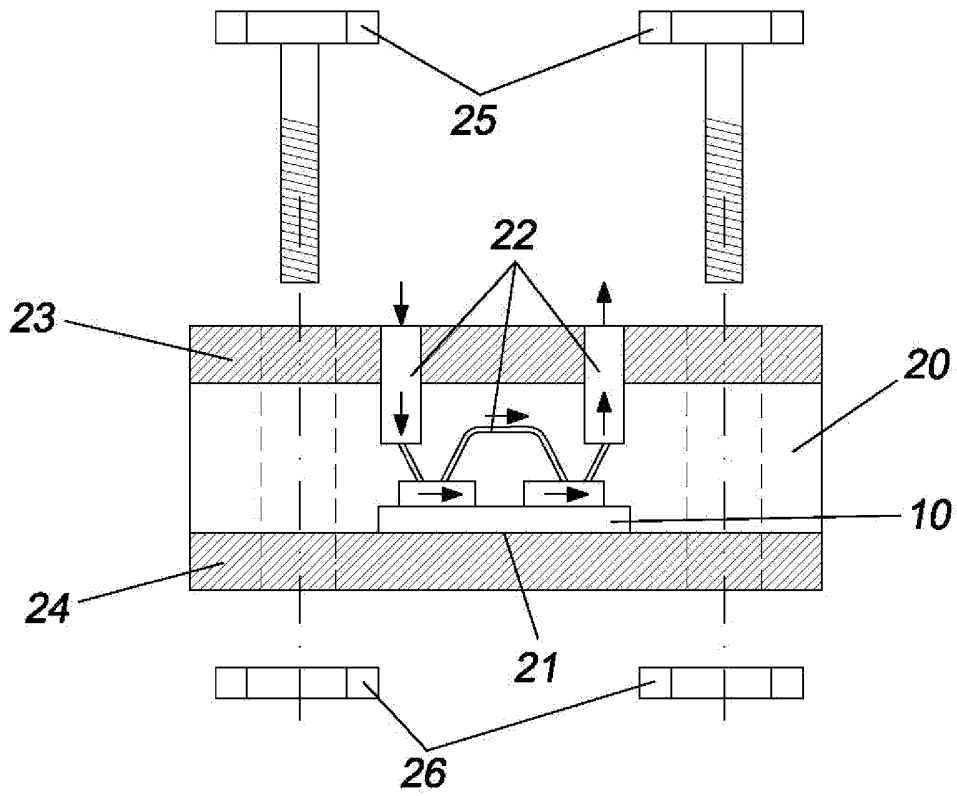


FIG. 2b

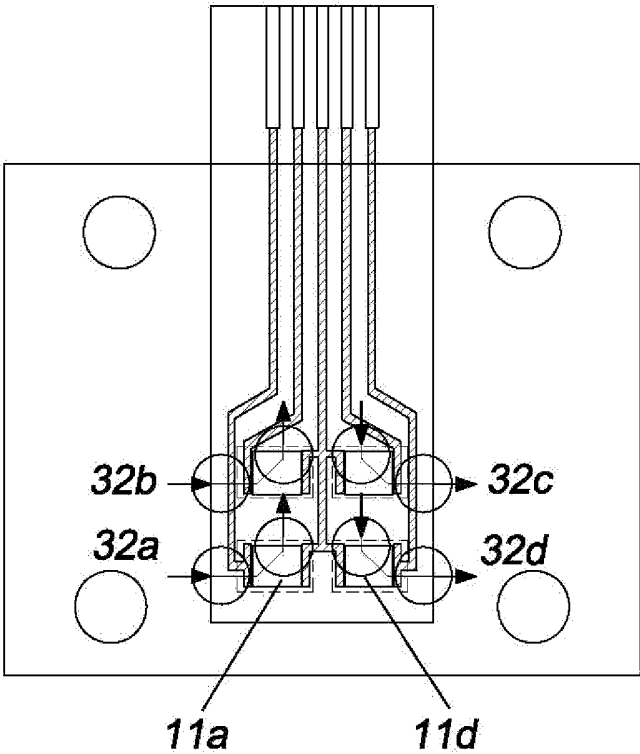


FIG. 3a

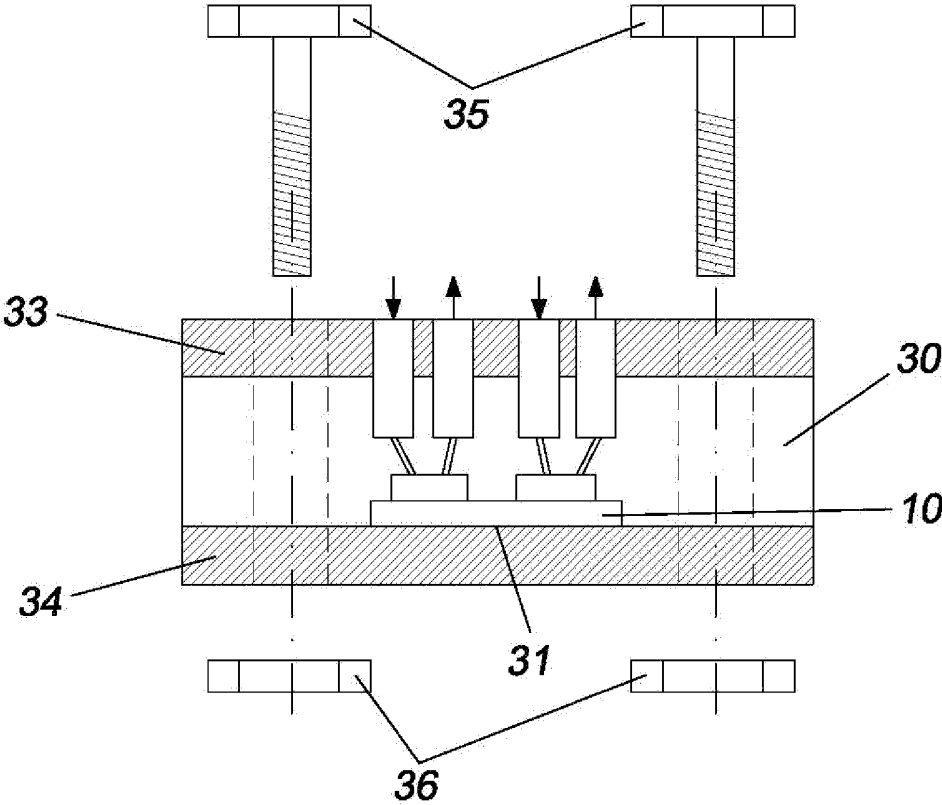


FIG. 3b

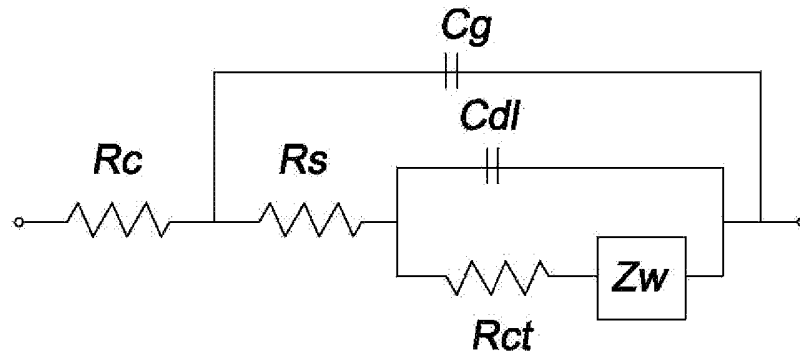


FIG. 4

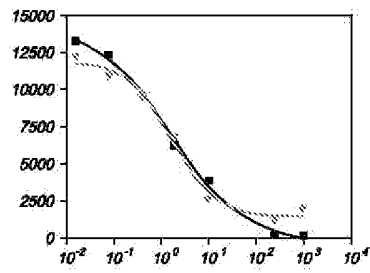


FIG. 5a

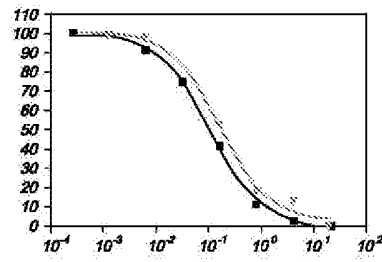


FIG. 5b

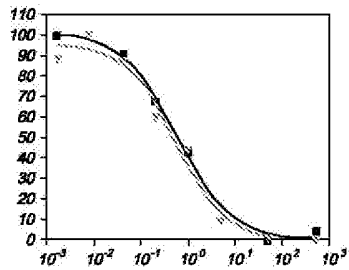


FIG. 5c

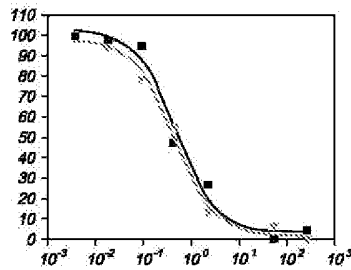


FIG. 5d



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200931164

22 Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2009

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2307430 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.11.2008, página 3, líneas 16-18,24-37,44-46,48-51; página 4, líneas 1-2,16-21,53-56.	1-12
A	US 20080297169 A1 (GREENQUIST et al.) 04.12.2008, párrafos [0007],[0008],[0010],[0015],[0065]; figuras 1-3B.	1-12
A	US 20020028441 A1 (HINTSCHE et al.) 07.03.2002, párrafos [0021],[0023]; reivindicación 1.	1-12

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.10.2011

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N27/02** (2006.01)

**G01N27/07** (2006.01)

**G01N33/53** (2006.01)

**G01N33/538** (2006.01)

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.10.2011

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-12  
Reivindicaciones

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 1-12  
Reivindicaciones

SI  
NO

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

**Base de la Opinión.-**

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



**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2307430 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	16.11.2008
D02	US 20080297169 A1 (GREENQUIST et al.)	04.12.2008
D03	US 20020028441 A1 (HINTSCHE et al.)	07.03.2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente tal y como ha sido redactada hace referencia a un sistema multianalítico múltiple basado en medidas impedimétricas para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra o para la detección simultánea de un analito en varias muestras y que se caracteriza porque comprende un chip multielectrodo, una celda de conducto único, y una segunda celda de conductos múltiples (reivindicación 1). Dicho sistema comprende además un dispositivo de excitación y procesamiento conectado al chip (reivindicación 2). Los electrodos situados en el extremo distal se encuentran conectados eléctricamente mediante unas pistas a unos conectores (reivindicación 3). Los microelectodos y las pistas están hechos de TaSi<sub>2</sub> (reivindicación 4). Dicho sistema analítico tiene también unas barreras dieléctricas que separan los electrodos unos de otros (reivindicación 5). Las pistas comprenden un recubrimiento dieléctrico para su protección (reivindicación 6). Tanto las barreras dieléctricas como el recubrimiento dieléctrico están hechos de SiO<sub>2</sub> (reivindicación 7). Cada celda está fijada a dos láminas de soporte (reivindicación 8). Por otro lado, se reivindica también un procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de varios analitos en una única muestra mediante el sistema analítico múltiple (reivindicaciones 9 y 10), y un procedimiento para la detección y/o cuantificación simultánea de un único analito en varias muestras mediante dicho sistema analítico impedimétrico (reivindicaciones 11 y 12).

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP ARTS. 6 Y 8**

El documento D01 hace referencia a un biosensor para la determinación directa de la presencia de analitos que se encuentran en una muestra biológica (véase página 3, líneas 16-18 y página 4, líneas 1-2). Dicho biosensor comprende: un sustrato aislante o cubierto con al menos una capa aislante, un par de electrodos interdigitados, una barrera de un material aislante y moléculas receptoras químicamente inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante o sobre los electrodos (véase página 3, líneas 24-37). La capa aislante o dieléctrica puede ser de dióxido de silicio (véase página 3, líneas 44-46). Los electrodos pueden ser, de entre otros materiales, de siliciuro de Tántalo (véase página 3, líneas 48-51). A dichos electrodos se les aplica un voltaje y, a través de un dispositivo de detección al que están conectados se percibe los cambios de impedancia que se producen (véase página 4, líneas 16-21). Y por último, los analitos o moléculas a determinar en una solución o muestra son entre otros, anticuerpos, antígenos etc (véase página 4, líneas 53-56).

El documento D02 trata de un dispositivo y métodos para llevar a cabo múltiples ensayos en muestras, como pueden ser sangre, plasma, suero etc. Los ensayos pueden ser sobre el cambio de viscosidad, agregación celular, ensayos inmunológicos, de analitos, etc. El sistema analizador aplica un potencial eléctrico a la muestra para detectar la impedancia (véase párrafos [0007] y [0008]). El dispositivo incluye un sustrato en forma de lámina que define una superficie para recibir la muestra y unos micro-canales para liberar el fluido a una o más cámaras de ensayo, conteniendo cada una de ellas dos electrodos. Los electrodos reciben un potencial eléctrico y dicho potencial eléctrico se traduce en un registro de impedancia procesado por el dispositivo de dicho documento (véase párrafos [0010], [0015] y figuras 1-3B). Y por último, el presente invento puede aplicarse también a ensayos inmunológicos tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos (véase párrafo [0065]).

El documento D03 se refiere a un método para la detección de especies moleculares y al sensor electrónico que lleva a cabo dicho método. La muestra que ha de ser medida se pone en contacto con una disposición de ultra-microelectrodos que tiene al menos dos electrodos (véase reivindicación 1). Una aplicación particularmente importante de dicho documento es la inmunodetección, que utiliza el principio de reacción inmune antígeno/anticuerpo (véase párrafo [0021]) y con dicho dispositivo se miden los cambios de impedancia producidos (véase párrafo [0023]).

Ninguno de los documentos citados solos o en combinación, revelan el sistema multianalítico múltiple basado en medidas de impedancia, ni los procedimientos de detección de dicho sistema analítico definidos en las reivindicaciones 1-12, además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones, por lo que la presente solicitud de patente se considera que tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP arts. 6 y 8.