(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 370 762**

(21) Número de solicitud: 201000738

(51) Int. CI.:
G01N 27/327 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **02.06.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2011**

Fecha de la concesión: **27.07.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **08.08.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **08.08.2012**

(73) Titular/es:
UNIVERSIDAD DE BURGOS
HOSPITAL DEL REY, S/N
09001 BURGOS, ES

(72) Inventor/es:
ARCOS MARTINEZ, JULIA;
DOMINGUEZ RENEDO, OLGA;
ALONSO LOMILLO, MARIA ASUNCION y
ASTURIAS ARRIBAS, LAURA

(74) Agente/Representante:
No consta

(54) Título: **DISPOSITIVO ELECTRÓDICO PARA LA DETECCIÓN DE COCAÍNA, PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y USO DE DICHO DISPOSITIVO.**

(57) Resumen:
La presente invención consiste en un dispositivo electródico para la detección de cocaína, con tres electrodos, obtenidos todos los electrodos por serigrafía, modificándose uno de ellos con una enzima, así como su procedimiento de fabricación y su uso en la detección citada.

ES 2 370 762 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Dispositivo electródico para la detección de cocaína, procedimiento de fabricación y uso de dicho dispositivo.

Objeto de la invención

La presente invención se enmarca en el campo de las celdas electroquímicas aplicadas al análisis de sustancias.

Así, la presente invención se refiere a un dispositivo electródico para la detección de cocaína, con tres electrodos, obtenidos todos los electrodos por serigrafía, modificándose uno de ellos con una enzima, así como su procedimiento de fabricación y su uso en la detección citada.

Antecedentes de la invención

Las celdas electroquímicas son de gran interés en el análisis de sustancias debido a su robustez, fabricación sencilla y económica.

Una de las técnicas más utilizadas para la fabricación de los electrodos que se utilizan en las celdas electroquímicas es la serigráfica. Esta técnica permite construir sensores químicos con una reproducibilidad y una infraestructura mínima.

La serigrafía es un método de impresión directa, también llamado de impresión por penetración. La deposición de tintas se realiza capa a capa sobre un sustrato. La calidad de los sensores químicos así fabricados depende, en gran medida, de los materiales utilizados.

Mediante la tecnología de electrodos serigrafiados es posible la miniaturización de los sensores ofreciendo la ventaja de ser versátiles, pueden ser fabricados con distintas configuraciones de electrodos y con diferentes tintas, y tener bajo coste pudiendo así prestarse para la producción en masa de electrodos desechables.

Para aumentar la selectividad de los electrodos se modifican por diferentes métodos, por ejemplo inmovilizando una sustancia en su superficie.

El método de inmovilización es muy importante ya que va a influir en el tiempo de vida del sensor y en su sensibilidad. Así, hay distintos tipos de inmovilización: por absorción, por microencapsulación, por atrapamiento, por entrecruzamiento, y por unión covalente.

Tradicionalmente, la determinación de cocaína y sus metabolitos se ha realizado mediante técnicas cromatográficas, normalmente acopladas a detectores de masas, en muestras biológicas tales como sangre u orina, pelo, meconio o saliva. También se han descrito inmunoensayos enzimáticos y radioinmunoensayos. Estas técnicas de ensayos implican instalaciones costosas y procedimientos largos, complicados y costosos.

La presente invención solventa estas desventajas mediante un dispositivo electródico, cuya simplicidad, bajo coste y su relativo corto tiempo de análisis, comparado con las técnicas cromatográficas, ha supuesto un gran avance en su empleo en muchos campos.

En el caso de la cocaína, teniendo en cuenta los grupos funcionales presentes en su molécula susceptibles de sufrir reacciones de oxido-reducción, pueden distinguirse dos tipos de procedimientos electroquímicos de detección:

- Basados en la señal de oxidación irreversible registrada a 1 V aproximadamente como resultado de la oxidación de la amina ternaria, tanto en electrodo de pasta de carbono como carbón vitrificado, en disoluciones de pH superior a 6.5.
- Basados en la señal de reducción registrada entre -1.5 y 1 V como resultado de la reducción de los grupos ésteres, en electrodos de mercurio, en disoluciones de pH superior a 7.

En estos procedimientos electroquímicos se han utilizado técnicas tales como voltamperometría cíclica, voltamperometría de onda cuadrada y diferencial de impulsos con acumulación, y amperometría.

También, se han descrito procedimientos para la determinación de cocaína basados en el empleo de inmunosensores amperométricos con electrodo de oxígeno, modificados con peroxidasas y anticuerpos de anti-benzoilecgonina, y electrodos selectivos potenciométricos de membrana.

Sin embargo, a pesar de la conocida interacción de la cocaína con algunos enzimas, la utilización de biosensores enzimáticos, que han mostrado su utilidad en numerosas determinaciones de distintos campos, no ha sido desarrollada para la determinación de esta droga.

La presente invención aúna las ventajas de los dispositivos electródicos con el uso de enzimas específicos para la detección de cocaína.

Descripción de la invención

La presente invención queda establecida y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la misma.

A la vista de lo anteriormente enunciado, la presente invención se refiere a un dispositivo electródico para la detección de cocaína obtenido por serigrafía caracterizado porque comprende tres electrodos, cada electrodo consta de un contacto, un tramo y un área activa, siendo un electrodo de trabajo, uno auxiliar y otro de referencia, constituidos todos los electrodos por serigrafía de una tinta de carbono sobre una lámina plástica de poliéster, además el área activa del electrodo de referencia se imprime con una tinta de Ag/AgCl, el área activa del electrodo de trabajo se modifica de manera que se inmoviliza el enzima CYP450 en su superficie.

Asimismo, la presente invención se refiere a un proceso de fabricación del dispositivo anteriormente mencionado que comprende las siguientes etapas:

- serigrafiado de una lámina de poliéster con tinta de carbono para formar el contraelectrodo, el electrodo de trabajo, contacto y tramo para el electrodo de referencia,
- serigrafiado del área activa del electrodo de referencia con Ag/AgCl,
- serigrafiado de un aislante cubriendo todos los tramos de los electrodos,
- modificación del área activa del electrodo de trabajo mediante inmovilización del enzima CYP450 en su superficie.

Y, la presente invención se refiere al uso del dispositivo anteriormente mencionado que comprende las siguientes etapas:

- introducción del dispositivo en una celda electroquímica que contiene 5 mL de de una solución tam-

pón de dihidrogenofosfato sódico con pH 8.1, 50 mM y KCl 100 mM,

- unión de los contactos de los electrodos a un potenciostato,
- aplicación de un potencial de -0.25 V entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo,
- espera a estabilización de corriente,
- adición de 100 μL de disolución problema de cocaína previamente diluida,
- sucesivas adiciones de 100 μL de disolución 10^{-6} M de cocaína,
- registro de las intensidades de corriente,
- representación de la recta de calibrado,
- extrapolación de dicha recta de calibrado para calcular la concentración de cocaína en la muestra problema.

Descripción de las figuras

Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de figuras, ilustrativas del ejemplo preferente y nunca limitativas de la invención.

La figura 1 representa una vista en alzado de los electrodos de una primera realización.

La figura 2 representa una vista en alzado de los electrodos con aislante de una segunda realización.

Exposición detallada de la invención

En la realización aquí detallada, la invención se refiere a un dispositivo electródico para la detección de cocaína, con tres electrodos (1, 2, 3), obtenidos todos los electrodos por serigrafía, modificándose uno de ellos con una enzima, así como su procedimiento de fabricación y su uso en la detección citada.

Como la técnica serigráfica implica el uso de materiales concretos y da lugar a la configuración geométrica concreta del dispositivo, la exposición de dicha técnica de fabricación sirve asimismo de explicación de la configuración del dispositivo, pudiendo ir ligadas ambas, configuración y técnica o procedimiento de fabricación, durante la presente exposición detallada de la invención.

El citocromo P450 (CYP450) es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos y es conocida su actividad frente a la cocaína.

El sistema citocromo P450 (CYP450) presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de substratos que es capaz de metabolizar. Si bien el CYP450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Salvo contadas excepciones, el CYP450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. Se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua. Entre las oxidaciones catalizadas por el CYP450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N. y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones.

De entre todas las familias de esta hemoproteína, el citocromo utilizado en esta invención es el CYP450 de la familia 2B4. Los enzimas de la familia CYP2B prefieren sustratos como el fenobarbital y otros medicamentos relacionados con el barbital, benzfetaminas y otras aminas alifáticas entre las cuales se encuentra la cocaína (en cuya estructura tiene un grupo amina alifática).

La invención se refiere al dispositivo, procedimiento de fabricación y de uso de un dispositivo de tres electrodos (1, 2, 3) desechables, serigrafiados en un soporte de poliéster, en concreto politereftalato de etileno (PET) , cuya disposición espacial permita el rápido análisis "*in situ*" de pequeños volúmenes de muestra por técnicas electroquímicas.

El dispositivo consta de tres electrodos serigrafiados (1, 2, 3): electrodo auxiliar (1) o contraelectrodo, electrodo de trabajo (2) y electrodo de referencia (3).

Los electrodos tienen tres zonas o partes diferenciadas: los contactos (1.3, 2.3, 3.3) o bornes, para su conexión a un potenciostato de los conocidos; las áreas activas (1.1, 2.1, 3.1), en contacto directo con la muestra a analizar; los tramos (1.2, 2.2, 3.2), como unión entre contactos (1.3, 2.3, 3.3) y áreas activas (1.1, 2.1, 3.1).

El procedimiento de fabricación, serigrafiado, del dispositivo se lleva a cabo con la ayuda de una serie de pantallas, moldes o patrones de serigrafiado en las que aparece, en una superficie porosa, el esquema del motivo a imprimir que será la forma de los electrodos:

- El primer patrón se utiliza para formar serigrafiando con pasta o tinta conductora de carbono el contraelectrodo (1), el electrodo de trabajo (2), contacto (3.3) y tramo (3.2) para el electrodo de referencia (3). Es decir, se crea la base conductora eléctrica del dispositivo. Después de su aplicación esta capa debe curarse durante 30 minutos a 120ºC.
- El segundo patrón está diseñado para la obtención del área activa (3.1) del electrodo de referencia (3). Para su formación se imprime un producto comercial a base de Ag/AgCl sobre la base conductora en la zona del área activa de dicho electrodo, que posteriormente se somete a un proceso de curación en las mismas condiciones, 30 minutos a 120ºC.
- Por último, el tercer patrón es una última capa de tinta aislante que cubre los tramos (1.2, 2.2, 3.2), dejando libre los contactos (1.3, 2.3, 3.3) y áreas activas (1.1, 2.1, 3.1) de los electrodos. La correcta formación de esta capa aislante (5) exige la curación a 80ºC durante 30 minutos.

Los tres electrodos (1, 2, 3), en esta realización, son de geometría rectangular. Las mejores dimensiones del área activa (3.1) del electrodo de referencia del dispositivo corresponden a 2 mm de anchura por 6 de longitud.

Para el electrodo de trabajo (2) la mejor dimensión probada de su área activa (2.1) corresponde a un cuadrado de 4 mm^2.

En una primera realización, el electrodo auxiliar o contraelectrodo (1) tiene una forma rectangular, como se ve en la figura 1. En una segunda realización, el electrodo auxiliar tiene forma arqueada, como se ve en la figura 2.

La inmovilización del enzima CYP450 sobre el electrodo de trabajo (2) consta de varias etapas:

- En la primera etapa, el electrodo (2) se sumerge en una disolución 3 mM de $N_2C_6H_4NO_2$ BF_4 en acetonitrilo 0.1M de NB_4BF_4, y mediante un barrido de potencial, entre 0.8 y -0.4 V, se deposita electroquímicamente la sal de diazonio sobre el electrodo de carbono.
- En la segunda etapa, se reducen los grupos nitro de la sal a grupos amina mediante barridos voltamperométricos, de 0 a -1.7 V, en una disolución desoxigenada 0.1M KCl de una mezcla 9:1 agua/etanol.

En el primer barrido voltamperométrico se produce la reducción de los grupos nitro a amino, dando un pico pronunciado de reducción en torno a -1.2 V. En un segundo barrido, se observa el equilibrio amina hidroxilamina de la sal electrodepositada.

- En la tercera y última etapa se inmoviliza el enzima en sí. Para ello se deposita 5 μl de enzima sobre el electrodo de trabajo y sobre ésta se añaden 2 μl de una disolución 20 mM de NHS en tampón fosfato pH 4 y 2 μl de una disolución 40 mM de EDC preparada en el mismo tampón. El electrodo se deja inmovilizando durante 90 minutos a una temperatura de 4ºC, tras el cual ya está listo para realizar medidas cronoamperométricas.

El dispositivo así constituido es un sensor miniaturizado cuya geometría es óptima para el análisis de muestras reales liquidas de pequeño tamaño. La adición de un pequeño volumen con una micropipeta directamente sobre el sistema electródico permite el análisis sin necesidad de utilizar una celda electroquímica convencional, haciendo más fácil, rápido y económico el análisis "*in situ*" al ser susceptible de ser conectado a un potenciostato portátil comercial. Alternativamente el sistema puede introducirse en una celda electroquímica en la que se encuentran en disolución la cocaína.

Para poner en funcionamiento el dispositivo, se unen las partes superiores conductoras (1.3, 2.3, 3.3) de cada uno de los electrodos (1, 2, 3) con los bornes de salida de un potenciostato a través de unas conexiones eléctricas. A través de éste y de acuerdo con la técnica seleccionada para llevar a cabo la determinación amperométrica, se impone una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (2) y el contraelectrodo (1) y se registra la intensidad que se origina en el circuito debido a las reacciones electroquímicas que la perturbación de potencial provoca, con la adición de cocaína y que va a permitir poner de manifiesto la presencia de los analitos.

Para llevar a cabo la determinación de una muestra problema de cocaína, se parte de la celda electroquímica que contiene 5 mL de de una solución tampón de dihidrogenofosfato sódico con pH 8.1, 50 ni y KCl 100 mM. A continuación se conecta el potenciostato y se aplica un potencial de -0.25 V entre el electrodo de trabajo (2) y el contraelectrodo (1). En ese momento se aprecia una intensidad de corriente alta que se estabiliza pasados unos minutos. Cuando se obtiene una señal estable de la intensidad de la corriente, se lleva a cabo una adición de 100 μL de disolución problema de cocaína previamente diluida, observándose 1 salto de intensidad debido al proceso de reducción electroquímica experimentado. A continuación se hacen sucesivas adiciones de de 100 μL de disolución 10^{-6} M de cocaína, observándose sucesivos saltos de intensidad.

Se obtiene la recta de calibración correspondiente. Se calculan las intensidades de las sucesivas adiciones y estos valores se representan frente a la concentración originando una recta cuya intersección con el eje de abscisas permite obtener, por extrapolación, la concentración de la muestra problema en molaridad que posteriormente se transforma en % teniendo en cuenta el peso de la muestra de partida.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo electródico para la detección de cocaína obtenido por serigrafía **caracterizado** porque comprende tres electrodos (1, 2, 3), cada electrodo consta de un contacto (1.3, 2.3, 3.3), un tramo (1.2, 2.2, 3.2) y un área activa (1.1, 2.1, 3.1), siendo un electrodo de trabajo (2), uno auxiliar (1) y otro de referencia (3), constituidos todos los electrodos por serigrafía de una tinta de carbono sobre una lámina plástica de poliéster, además el área activa (3.1) del electrodo de referencia (3) se imprime con una tinta de Ag/AgCl, el área activa (2.1) del electrodo de trabajo (2) se modifica de manera que se inmoviliza el enzima CYP450 en su superficie.

2. Dispositivo electródico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el enzima es el CYP450 de la familia 2B4.

3. Dispositivo electródico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los contactos (1.3, 2.3, 3.3), los tramos (1.2, 2.2, 3.2) y las áreas activas de los electrodos de trabajo (2.1) y referencia (3.1) son de forma rectangular.

4. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el área activa (3.1) del electrodo de referencia tiene 2 mm de anchura por 6 mm de longitud.

5. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el área activa (2.1) del electrodo de trabajo (2) es un cuadrado de 4 mm^2.

6. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el área activa (1.1) del electrodo auxiliar es rectangular.

7. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el área activa (1.1) del electrodo auxiliar es en forma de arco.

8. Proceso de fabricación del dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- serigrafiado de una lámina de poliéster con tinta de carbono para formar el contraelectrodo (1), el electrodo de trabajo (2), contacto (3.3) y tramo (3.2) para el electrodo de referencia (3),
- serigrafiado del área activa (3.1) del electrodo de referencia con Ag/AgCl,
- serigrafiado de un aislante (5) cubriendo todos los tramos (1.2, 2.2, 3.2) de los electrodos,
- modificación del área activa (2.1) del electrodo de trabajo mediante inmovilización del enzima CYP450 en su superficie.

9. Uso del dispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- introducción del dispositivo en una celda electroquímica que contiene 5 mL de de una solución tampón de dihidrogenofosfato sódico con pH 8.1, 50 mM y KCl 100 mM,
- unión de los contactos (1.3, 2.3, 3.3) de los electrodos a un potenciostato,
- aplicación de un potencial de -0.25 V entre el electrodo de trabajo (2) y el contraelectrodo (1),
- espera a estabilización de corriente,
- adición de 100 μL de disolución problema de cocaína previamente diluida,
- sucesivas adiciones de 100 μL de disolución 10^{-6} M de cocaína,
- registro de las intensidades de corriente,
- representación de la recta de calibrado,
- extrapolación de dicha recta de calibrado para calcular la concentración de cocaína en la muestra problema.

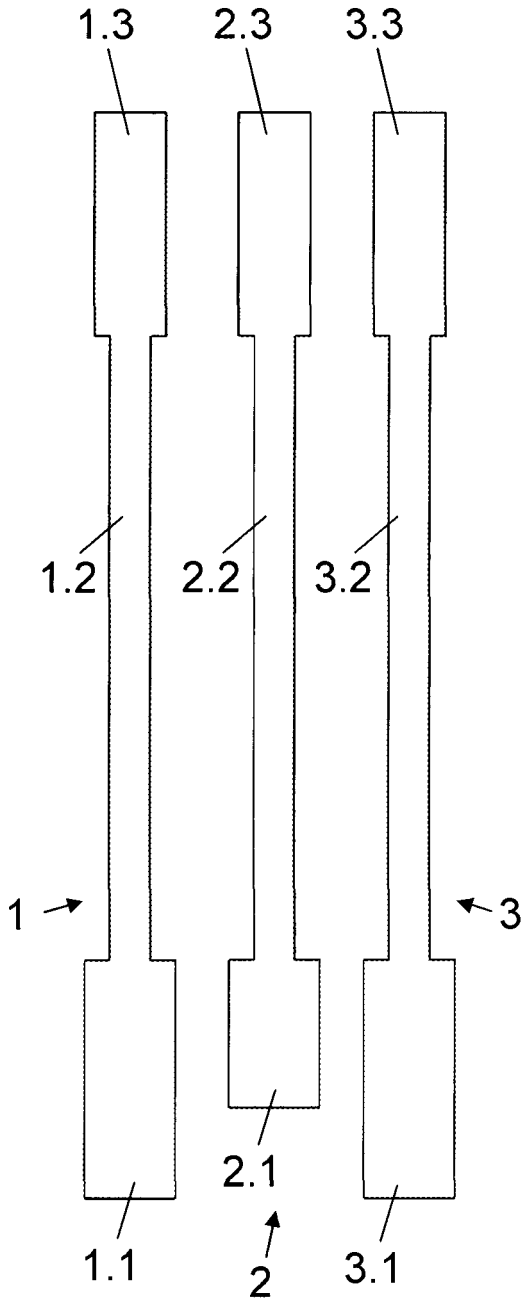

Fig.1

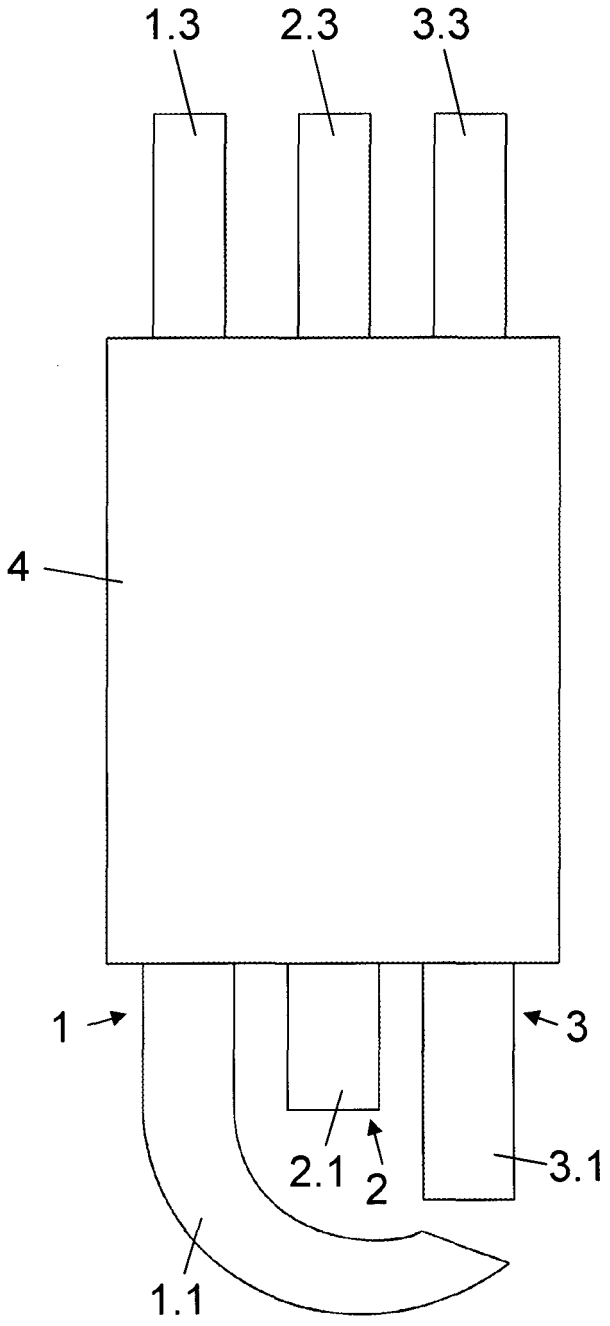

Fig.2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201000738

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N27/327*** (2006.01)
C12Q1/26 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ALONSO-LOMILLO, M.A., et al., CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium sal and thiols monolayers, Analytica Chimica Acta, 2009, Vol. 633, págs. 51-56; apartados: "1.Introduction", "2.Reagents and solutions", "4.Methods"; figs. 1, 5 y 6.	1,2,5,7,8
X	CARRARA, S., et al., Dynamical spot queries to improve specificity in P450s based multi-drugs monitoring, ICME International Conference on Complex Medical Engineering, [en línea], abril 2009, págs. 1-6 [Recuperado el 07.06.2011] <DOI: 10.1109/ICCME.2009.4906648>; apartado: "Materials and methods", y fig. 6.	1,2
X	SHUMYANTSEVA, V.V., et al., Electrochemical properties of cytochroms P450 using nanostructured electrodes: direct electron transfer and electro catalysis, J. Inorganic Biochemistry, 2007, Vol. 101, págs. 859-865; apartado: "2.Materials and methods".	1,2
A	POET T. S., et al., Inactivation of Cytochromes P450 2B Protects Against Cocaine-Mediated Toxicity in Rat Liver Slices, Toxicology and Applied Pharmacology, 1994, Vol. 126, págs. 26-32. Resumen.	1-9

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	Examinador	Página
24.06.2011	M. García Poza	1/5

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

G01N, C12Q

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, XPESP, CAPLUS, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,4,6,9	**SI**
	Reivindicaciones	1,2,5,7,8	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	9	**SI**
	Reivindicaciones	1-8	**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	ALONSO-LOMILLO, M.A., et al., CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium sal and thiols monolayers, Analytica Chimica Acta, 2009, Vol. 633, págs. 51-56.	
D02	CARRARA, S., et al., Dynamical spot queries to improve specificity in P450s based multi-drugs monitoring, ICME International Conference on Complex Medical Engineering, [en línea], abril 2009, págs.1-6 [Recuperado el 07.06.2011] <DOI: 10.1109/ICCME.2009.4906648>.	
D03	SHUMYANTSEVA, V.V., et al., Electrochemical properties of cytochroms P450 using nanostructured electrodes: direct electron transfer and electro catalysis, J. Inorganic Biochemistry, 2007, Vol. 101, págs. 859-865.	
D04	POET T. S., et al., Inactivation of Cytochromes P450 2B Protects Against Cocaine-Mediated Toxicity in Rat Liver Slices, Toxicology and Applied Pharmacology, 1994, Vol. 126, págs. 26-32.	

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

El objeto de la invención es un dispositivo electródico de tres electrodos, su procedimiento de fabricación y su uso para la detección de cocaína.

- Novedad (Art. 6.1 LP):

El documento D01 divulga un dispositivo electródico obtenido por serigrafía que comprende tres electrodos, cada electrodo consta de un contacto, un tramo y un área activa, siendo un electrodo de trabajo, uno auxiliar y otro de referencia, constituidos todos los electrodos por serigrafía de una tinta de carbono sobre una lámina plástica de poliéster, además el área activa del electrodo de referencia se imprime con una tinta de Ag/AgCl y el área activa del electrodo de trabajo se modifica de manera que se inmoviliza el enzima CYP450 en su superficie, concretamente P450 2B4.

El documento D02 divulga un dispositivo electródico obtenido por serigrafía que comprende tres electrodos, siendo un electrodo de trabajo, uno auxiliar (de grafito) y otro de referencia, que se imprime con una tinta de Ag/AgCl. El área activa del electrodo de trabajo se modifica de manera que se inmoviliza el enzima P450 2B4 (CYP450) en su superficie.

El documento D03 divulga un dispositivo electródico obtenido por serigrafía que comprende tres electrodos, siendo un electrodo de trabajo, uno auxiliar y otro de referencia, el electrodo de trabajo está constituido por grafito y el electrodo de referencia se imprime con una tinta de Ag/AgCl. El área activa del electrodo de trabajo se modifica de manera que se inmoviliza el enzima P450 2B4 (CYP2B4) en su superficie.

A la vista de la información divulgada en los documentos anteriormente citados se concluye que el dispositivo de la invención según se recoge en las reivindicaciones 1 y 2 carece de novedad.

Las características adicionales del dispositivo, según se recogen en las reivindicaciones 5 y 7 también se encuentran divulgadas en el documento D01, ya que el área del electrodo de trabajo es de 4 mm2 y además el electrodo auxiliar tiene forma de arco.

También el procedimiento de fabricación del dispositivo, recogido en la reivindicación 8 de la solicitud, se encuentra divulgado en el documento anteriormente citado. Dicho procedimiento consta de las siguientes etapas: serigrafiado de una lámina de poliéster con tinta de carbono, serigrafiado con Ag/AgCl para formar el electrodo de referencia, serigrafiado con un aislante y modificación del área activa del electrodo de trabajo mediante la inmovilización de la enzima CYP450. Por lo que dicha reivindicación 8 carece de novedad.

- Actividad inventiva (Art. 8.1 LP):

Las características adicionales del dispositivo de la invención recogidas en las reivindicaciones 3, 4 y 6 son meras disposiciones geométricas de los electrodos del dispositivo que son obvias para el experto en la materia a la vista de la información divulgada en el estado de la técnica. Por lo tanto, dichas reivindicaciones carecen de actividad inventiva.

Por último, en el estado de la técnica se divulga el uso del dispositivo electródico serigrafíado de tres electrodos para la detección de fenobarbital, un anticonvulsivo (documento D01) y benfetamina, un anorexígeno (documentos D02 y D03). El procedimiento seguido para la detección de estos medicamentos en la introducción del dispositivo en una celda electroquímica que contiene una solución tampón, la unión de los contactos a un potenciostato, la aplicación de un potencial entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, la adición paulatina de la disolución problema midiendo en cada caso la intensidad de corriente para así obtener la recta de calibrado a partir de la cual se obtiene la concentración de fármaco de la muestra problema.

La diferencia entre el uso del dispositivo en los documentos citados (D01-D03) y el uso de la invención recogido en la reivindicación 9 es la sustancia a detectar, siendo la cocaína en el caso de la invención.

En el documento D04 se analiza la efectividad del enzima CYP450 en el metabolismo de la cocaína. Sin embargo, la detección de la cocaína mediante el uso del dispositivo electródico de la invención depende de las variables del procedimiento electroquímico. Por ello, no sería obvio para el experto en la materia llegar al uso de la invención, según se recoge en la reivindicación 9, a partir de la información divulgada en los documentos citados. Por lo tanto, el objeto de la invención recogido en la reivindicación 9 es nuevo y tiene actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).