(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 389 936**

(21) Número de solicitud: 201100400

(51) Int. CI.:

G01N 27/327 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C07C 245/20 (2006.01)
B01J 31/06 (2006.01)
C25B 11/06 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

05.04.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

05.11.2012

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

12.06.2013

Fecha de la concesión:

17.01.2014

(45) Fecha de publicación de la concesión:

24.01.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VIGO (100.0%)
CAMPUS UNIVERSITARIO DE VIGO S/N
36310 VIGO (Pontevedra) ES

(72) Inventor/es:

GONZALEZ ROMERO, Elisa;
GONZALEZ COSTAS, Javier Marcos;
GONZALEZ VEIGA, Maria Cristina y
CARRO PEREZ, Iria

(54) Título: **SUPERFICIE CATALITICA**

(57) Resumen:

La presente invención es una superficie catalítica que inmoviliza por cross-linking la dopamina sobre una plataforma base funcionalizada con el ion 4-nitroarenodiazonio. Esta superficie catalítica presenta una elevada actividad catalítica frente a la detección del Hexacianoferrato (III), mediador implicado en reacciones de las enzimas oxidasas. La invención, con la inmovilización de la dopamina por formación de enlace covalente sobre la plataforma base funcionalizada, proporciona una mejor vida media del biosensor que la adsorción directa, requisito potencial exigible en el diseño de dispositivos o prototipos comercializados.

ES 2 389 936 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

SUPERFICIE CATALÍTICA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está comprendida en el campo de los sensores con la modificación superficial de materiales conductores y semiconductores para la obtención de superficies que presenten una actividad catalítica elevada frente a compuestos de interés. Esto repercutirá en una mejora muy significativa en los límites de detección y cuantificación de dichos compuestos, que sirvan de transductores electroquímicos en el diseño de biosensores. La intervención de las enzimas oxidasas teniendo como mediador el hexacianoferrato (III), hace que su campo de aplicación sea muy amplio, y en particular en clínica, medioambiente y alimentos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Uno de los objetivos que se persigue en el desarrollo de sensores y biosensores es la detección y determinación, sensible y selectiva, de sustancias de tipo biológico. Para ello, se conjugan la utilización de técnicas electroquímicas extremadamente sensibles como la polarografía o la voltamperometría de pulso diferencial, y la voltamperometría de onda cuadrada, con la sensibilidad que ofrecen las superficies catalíticas en el transductor base y la selectividad que muestra el uso de mediadores o sondas electroactivas.

Actualmente, se sigue investigando sobre el papel que juegan los iones arenodiazonio, ArN_2^+, en los procesos de carcinogénesis y mutagénesis de moléculas biológicas de especial relevancia. Además de eso, una de las tendencias actuales es analizar la versatilidad en su empleo como reactivo precursor en la fabricación de electrodos sólidos modificados, metálicos y no metálicos, que sirvan como transductores en aplicaciones biosensoras.

Se ha llevado a cabo la modificación superficial de diversos materiales con iones de arenodiazonio para diferentes aplicaciones. Todas ellas, aunque con enfoques muy diferentes, se basan en el diseño y desarrollo de superficies sensoras por funcionalización de dichas superficies con iones arenodiazonio como precursores.

No existen precedentes de la inmovilización del neurotransmisor dopamina sobre una superficie funcionalizada con monómeros precursores como los iones de arenodiazonio, mediante el empleo del agente bifuncional glutaraldehído, para la obtención de superficies catalíticas y, menos aún, con las características descritas en la presente invención.

J. M. Savéant, J. Pinson y M. Delamar han desarrollado superficies funcionalizadas con iones de arenodiazonio para fines anticorrosivos, llevándose a cabo el injerto de estos iones en medio orgánico a potencial fijo y sobre cualquier material (metálico y no metálico) (Pinson, J. Podvorica, F. "Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts" *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 429–439; Combellas, C. et al. "Steric Effects in the Reaction of Aryl Radicals on Surfaces", L*angmuir* **2009**, *25*, 286-293). Con la funcionalización, tal y como se describe en estas publicaciones, se obtienen superficies no conductoras que apantallan cualquier señal electroquímica de especies electroactivas. En la presente invención, sin embargo, a pesar de que se pierde la señal inicial con la funcionalización, el hecho de inmovilizar el neurotransmisor sobre la plataforma base funcionalizada da lugar a que se obtenga una superficie conductora con actividad catalítica sobre la misma, con el consiguiente incremento de la señal analítica.

A.J. Downard hace una modificación del electrodo de carbono con grupos 4-fenil acetato al injertar sobre la superficie el correspondiente ion arenodiazonio (Downard, A. et al. "Covalent modification of carbon electrodes for voltammetric differentiation of dopamine and ascorbic acid" *Anal. Chim. Acta,* **1995**, *317*, 303-310). La actividad catalítica de estas superficies les permitió detectar la dopamina en presencia del ácido ascórbico como principal interferencia, por debajo del nanomolar. La actividad catalítica la proporciona otro grupo funcional presente en la superficie diferente al de la dopamina, lo cual condiciona la reactividad del dispositivo de la publicación. La diferencia con el dispositivo de la presente invención se basa en que la superficie obtenida por A.J. Downard se utiliza para la determinación de la dopamina como analito, no está dicha dopamina implicada como reactivo en la modificación de la superficie del electrodo. La integración de la dopamina en el electrodo no es el resultado de un proceso obvio.

La misma selectividad frente a la detección de la dopamina a la encontrada por A.J. Downard se muestra en el trabajo de B.D. Bath, donde la superficie de fibra de carbono se modificó con grupos funcionales catecol por derivatización posterior de los grupos fenil-amino y fenil-carboxilo que procedían de la funcionalización de dichas superficies con los correspondientes iones arenodiazonio sustituidos con esos grupos funcionales (B.D. Bath et al. "Dopamine Adsorption at Surface Modified Carbon-Fiber Electrodes" *Langmuir* **2001**, *17*, 7032-7039). La modificación con dopamina en este trabajo de Bath se lleva a cabo en condiciones completamente diferentes a las propuestas en la presente invención: tampón acético/acetato de pH=4.5 y carbodiimida como agente funcional de enlace químico y funcionalización amperométrica, aplicando un potencial de -0.8 V vs Ag/AgCl. El procedimiento de funcionalización y derivatización según esta publicación es largo y tedioso y se necesita un mínimo de 26 horas hasta obtener la superficie modificada, mientras que el protocolo de la presente invención únicamente requiere 2 h. Esto último supone una ventaja en la disminución del tiempo de análisis lo que permite una mayor frecuencia de muestreo, aspecto importante si se trata de análisis en control de procesos en la industria alimentaria, análisis clínicos o en el medioambiente.

La publicación más cercana a la invención es un trabajo del grupo canadiense de D. Bélanger que funcionalizan la superficie amperométricamente a -0.4 V vs Ag/AgCl (KCl saturado) durante 5 s., generando "in situ" el ion arenodiazonio mediante la reacción de diazotación de la amina aromática correspondiente, sustituida con un catecol, con la adición de nitrito sódico en un medio orgánico como el acetonitrilo (Cougnon, C. et al. "In Situ Formation of Diazonium Salts from Nitro Precursors for Scanning Electrochemical Microscopy Patterning of Surfaces" Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 4006-4008). El ion arenodiazonio se injerta sobre la superficie con la función catecol dirigida hacia el seno de la disolución. Sin embargo, el procedimiento de modificación superficial del electrodo de carbono vítreo es muy diferente, lo que da lugar a la obtención de superficies no conductoras. En este trabajo la diazotación se lleva a cabo en medio orgánico, no utilizan un agente de enlace químico bifuncional y no observan actividad catalítica de la superficie; por el contrario, observan la pasivación de la misma cuando ésta es caracterizada con la sonda redox, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, teniendo lugar la disminución de la corriente de la sonda como consecuencia del recubrimiento y formación de una monocapa orgánica de 40µm.

Otro trabajo del grupo de D. Bélanger (Nguyen, N.H. et al. "Electrochemistry and Reactivity of Surface-Confined Catechol Groups Derived from Diazonium Reduction. Bias-Assisted Michael Addition at the Solid/Liquid Interface" Langmuir **2009**, *25*, 3504-3508) describe la funcionalización con iones de arenodiazonio hasta obtener la modificación superficial del electrodo carbono vítreo con el sistema Hidroquinona/Quinona y la derivatización posterior de dichas superficies mediante la adición de Michael como posible estrategia para la captura de materiales biológicos. La adición de Michael consiste en el ataque nucleófilo con el ferroceno de alquilamina. El procedimiento propuesto difiere de la presente invención en que el precursor para funcionalizar la superficie, el ion de arenodiazonio, está sustituido con la funcionalidad catecol, el cual se injerta, vía electroquímica (mediante ciclos entre 0 y -1 V vs SCE) en acetonitrilo, dando lugar a la formación de una monocapa orgánica enlazada covalentemente a la superficie del electrodo con grupos funcionales catecol dirigidos hacia el seno de la disolución. Además de funcionalizar la superficie en un medio orgánico, no utilizan un agente bifuncional de enlace químico. Una vez obtenida la superficie funcionalizada, ésta se derivatiza y los autores estudian el comportamiento electroquímico del producto de adición de Michael y la reactividad de dichas superficies, las cuales no presentan propiedades catalíticas como en la presente invención.

El problema que se plantea entonces en la técnica es encontrar una superficie catalítica que presente una mejora en la sensibilidad del análisis de metabolitos. La solución propuesta por la presente invención es una plataforma base funcionalizada que presenta dopamina unida de forma covalente a la superficie del electrodo ofreciendo grupos funcionales catecol dirigidos hacia el seno de la disolución, lo cual conserva las propiedades conductoras de la superficie y proporciona un aumento de la señal analítica obtenida gracias a su elevada actividad catalítica frente a mediadores empleados en biosensores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es una superficie catalítica que comprende un receptor biológico sobre una plataforma base funcionalizada, donde dicha plataforma base funcionalizada comprende al menos una función arilamina procedente de un ion arenodiazonio unida a una plataforma base y al menos un agente de enlace químico entrecruzante unido a dicha arilamina, donde se fija dicho receptor biológico. Este

receptor biológico presenta preferiblemente un grupo amino unido covalentemente a dicho agente de enlace químico entrecruzante, y más preferiblemente es la dopamina. El agente químico entrecruzante es multifuncional, preferiblemente bifuncional y más preferiblemente glutaraldehído. El ion arenodiazonio procede preferiblemente de la sal 4-Nitrobencenodiazonio Tetrafluorborato.

En la presente solicitud se entiende por "plataforma base funcionalizada" a aquella base transductora a la que se aplica un pretratamiento químico/electroquímico para aumentar el área activa de la superficie y, a continuación, se le injertan vía electroquímica radicales arilamina que dan lugar a la formación de una monocapa orgánica, enlazada covalentemente a la superficie del electrodo, con grupos funcionales amino dirigidos hacia el seno de la disolución.

En la presente solicitud se entiende por "unida", unida covalentemente.

La invención describe la modificación superficial de superficies conductoras y semiconductoras que puedan actuar de electrodos para obtener nuevas plataformas base con actividad catalítica. Para ello, dichas superficies son funcionalizadas con monómeros funcionales derivados de los iones arenodiazonio (precursores directos, los cuales se pueden obtener comercialmente) o a partir de las anilinas (precursores indirectos, en los que el grupo diazonio se genera por la reacción de diazotación *in situ* de la amina aromática correspondiente), para obtener monocapas autoensambladas de los monómeros injertados en dichas superficies.

De forma que una realización preferible es la superficie catalítica de la invención en que dicho ion arenodiazonio está generado in situ por diazotación de la 4-Nitroanilina.

Sobre estas superficies se inmoviliza el receptor biológico mediante el empleo de los agentes químicos preferiblemente bifuncionales, dando lugar a nuevas superficies biosensoras capaces de dar respuestas electroquímicas (sistema de transducción) muy sensibles.

Una realización preferible de la invención es el procedimiento de obtención de dicha superficie catalítica, que comprende las etapas de activación de la superficie de un

electrodo serigrafiado a escala nanométrica, funcionalización de la superficie activada de dicho electrodo serigrafiado en presencia de monómeros funcionales de arilamina y de al menos un agente químico entrecruzante para obtener una plataforma base funcionalizada, y fijado de al menos un receptor biológico sobre dicha plataforma base funcionalizada.

En una realización preferible de la invención, dicha activación comprende el barrido hacia potenciales catódicos en medio ácido de la superficie de dicho electrodo serigrafiado. En otra realización preferible, dicha funcionalización comprende el anclado de iones de arenodiazonio como precursores sobre la superficie de dicho electrodo serigrafiado activado para obtener una monocapa con grupos funcionales activos, seguido de la inmovilización sobre dicha monocapa de al menos un agente de enlace químico entrecruzante.

La primera etapa de activación de la superficie del electrodo serigrafiado es de crucial importancia al tratarse de electrodos serigrafiados sólidos (ya sean metálicos o no metálicos). Tiene el objetivo de aumentar el área activa de los mismos para alcanzar el máximo recubrimiento superficial en la siguiente etapa: la funcionalización y, por tanto, una mayor reproducibilidad del biosensor. En la Figura 1 se describen las condiciones para obtener las prestaciones y características mencionadas de los electrodos.

Una vez activados, se lava la superficie con agua ultrapura y se pasa, de forma inmediata, a la segunda etapa. La segunda etapa comprende la funcionalización de las superficies de los electrodos serigrafiados a escala nanométrica con monómeros funcionales: la reducción electroquímica de iones 4-Nitrobencenodiazonio, 4-NitroBD+, como precursores para producir los radicales arilo en la proximidad del electrodo, los cuales reaccionan con la superficie del mismo dando lugar a una monocapa autoensamblada con grupos funcionales activos dirigidos hacia el seno de la disolución. En el caso de utilizar como precursores las aminas aromáticas, éstas se someten, previamente, a un tratamiento químico para derivatizar, in situ, el grupo amino de la 4-Nitroanilina a grupo diazonio por diazotación en medio ácido y en presencia de nitrito sódico, generando el correspondiente ion arenodiazonio 4-sustituido por el grupo nitro. En la Figura 2 se muestra el procedimiento hasta funcionalizar los electrodos serigrafiados usando ambos tipos de precursores: 4-

Nitroanilina (0 en Figura 2, derivatizada por diazotación, previamente a la funcionalización, a ion 4-Nitrobencenodiazonio, 1 en Figura 2) e iones 4-Nitrobencenodiazonio (1 en Figura 2).

Los grupos nitro presentes en el monómero funcional de partida para la funcionalización (1 en Figura 2) son derivatizados electroquímicamente para generar grupos amino dirigidos hacia el seno de la disolución, los cuales son susceptibles de generar un enlace covalente con los receptores biológicos, utilizándose agentes químicos bifuncionales entrecruzantes o bifuncionales.

El electrodo serigrafiado funcionalizado se somete a la última etapa del procedimiento de la invención, la inmovilización del receptor biológico sobre la plataforma base funcionalizada. Tal y como se ha descrito previamente en la etapa de funcionalización, los grupos funcionales del monómero funcional utilizado, 4-NitroBD+, son derivatizados electroquímicamente para generar grupos funcionales que sean susceptibles de generar un enlace covalente con el receptor biológico, utilizándose agentes químicos entrecruzantes.

Esta tercera etapa está dividida en dos pasos. En el primero (Figura 3A), se trata de autoensamblar la segunda monocapa del dispositivo sensor, mediante el uso del agente entrecruzante, en este caso glutaraldehído (2 en Figura 3A), como intermedio de enlace entre la plataforma base funcionalizada, según etapa 2 en Figura 2 (1 en Figura 3A), y el receptor que en este caso es el neurotransmisor dopamina (DA) (2 en Figura 3B). En el segundo paso de esta etapa (Figura 3B), se inmoviliza la DA (2 en Figura 3B) vía enlace covalente sobre el extremo del agente bifuncional intermedio de enlace (3 en Figura 3A) de la plataforma base funcionalizada con monocapas autoensambladas (1 en Figura 3B), dirigido al seno de la disolución.

La superficie catalítica de la invención proporciona una elevada actividad catalítica, medida en una mayor sensibilidad y selectividad, frente a la detección del hexacianoferrato (III) (ferricianuro), mediador implicado en reacciones enzimáticas que generan peróxido de hidrógeno, en la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida), NADH, que sirve para regenerar el NAD^+, cofactor de un gran número de enzimas deshidrogenadas utilizadas como bioreceptores en

biosensores, antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido úrico y tirosina como moléculas de interés clínico.

La señal del hexacianoferrato (III) es del orden de 10 veces mayor sobre esta superficie catalítica que la obtenida sobre el electrodo desnudo. Si la inmovilización se lleva a cabo sobre la superficie sin funcionalizar, aunque existe catálisis, ésta es significativamente menor. La caracterización de las superficies ha dado evidencia clara de la existencia de las funcionalidades catecol inmovilizadas sobre la superficie, siguiendo la respuesta electroquímica del sistema hidroquinona/quinona, que son las que producen la catálisis.

La preparación de estos dispositivos, estables y robustos, es rápida. Proporcionan una elevada actividad catalítica frente a la detección del Hexacianoferrato (III), mediador implicado en reacciones enzimáticas que generan peróxido de hidrógeno, en la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida (NADH). El NADH sirve para regenerar el NAD+, cofactor de un gran número de enzimas deshidrogenadas utilizadas como bioreceptores en biosensores, antioxidantes como el ácido ascórbico y catecol y moléculas de interés clínico como ácido úrico y tirosina. Sectores como el de análisis clínicos, medio ambiente o agroalimentario utilizan dispositivos que se basan en la reacción anterior.

La funcionalización a escala nanométrica se ha llevado a cabo mediante la electroreducción de los precursores (procedentes de iones arenodiazonio o aminas aromáticas diazotadas *in situ)* por voltamperometría cíclica, CV, en medio acuoso sobre electrodos serigrafiados de carbono y carbono modificado (MWCNTs y CoPc). También se pueden utilizar otros electrodos como electrodos de pasta de carbono y film de mercurio o electrodos serigrafiados de oro. Para la caracterización de estas superficies se han empleado el catecol, extremo de las capas autoensambladas y antioxidante, el $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ como sonda redox y la voltamperometría cíclica como técnica de detección electroquímica, aunque también pueden ser utilizadas otras técnicas de detección electroquímicas como la voltamperometría de pulso diferencial, la detección cronoamperométrica de la intensidad de corriente generada por la reducción de la sonda presente y catalizada por estas superficies. En realidad, cualquier método analítico basado en la detección de la sonda podría ser utilizado con el fin de determinar la biomolécula generada, sea H_2O_2 o NADH, en un ensayo de

enzimático. Este trabajo ha demostrado que estas superficies funcionalizadas proporcionan una matriz rígida y compacta en la cual se pueden incorporar un gran número de componentes biológicos, tales como el neurotransmisor dopamina.

El uso de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ como sonda redox de moléculas de interés biológico y la metodología descrita en la presente invención presentan, en su conjunto, una serie de ventajas: la metodología de obtención de la plataforma base es sencilla y rápida, necesitándose un agente químico intermedio de enlace entre los monómeros funcionales injertados en la superficie y el neurotransmisor dopamina a inmovilizar. Otra ventaja a destacar es que las superficies sensoras obtenidas presentan una actividad catalítica hacia la sonda que alcanza valores de señal analítica 10 veces superior a las obtenidas sobre otras superficies sin modificar en unas condiciones de temperatura, fuerza fónica y pH cercanos a las condiciones fisiológicas, es decir, temperatura de 25 ºC, fuerza iónica 0,05 M y pH 7,4. En la funcionalización descrita anteriormente, por el contrario, la señal de la sonda desaparece por completo. Además, la sonda puede ser detectada con diferentes métodos analíticos de detección o cuantificación, dando lugar a señales mucho más sensibles.

El procedimiento de la invención da lugar a la inmovilización de biomoléculas por formación de enlace covalente, lo que proporciona una mejor vida media del biosensor, requisito potencial exigible para el diseño de dispositivos biomédicos con objeto de su posterior comercialización.

La presente invención tiene aplicación clínica, p.ej. para determinar la cantidad de glucosa en sangre; en medioambiente, p.ej. para determinar la existencia de peróxidos y metales en aguas potables; o en alimentación, p.ej. para determinar la existencia de lactato en cerveza.

De forma que otras realizaciones más son el uso de la superficie catalítica de la invención en la detección clínica de metabolitos y cofactores, en la detección de compuestos en la industria alimentaria, o en la detección de contaminantes en el medioambiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Esquema del procedimiento general de activación de la primera etapa. Activación de la superficie del electrodo serigrafiado de trabajo (1) mediante el empleo de 50 µL de una disolución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de concentración 0,1 M (2) por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0,5 V y -1,5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos.

Figura 2.- Esquema del procedimiento de funcionalización de la segunda etapa. Obtención de las plataformas base funcionalizadas al injertar los grupos arilamina (2 en figura 2) con grupos amino (3 en figura 2), obtenidos por derivatización, vía electroquímica, a partir de los grupos nitro presentes en el monómero funcional de partida (0-anilinas derivatizadas a iones arenodiazonio por diazotación en medio ácido HCl 1 M y en presencia de $NaNO_2$ 6%, durante 20 min a 4 ºC, o, directamente, 1-iones arenodiazonio), los cuales están dirigidos hacia el seno de la disolución.

Figura 3.- Inmovilización del neurotransmisor dopamina en la superficie de trabajo del electrodo serigrafiado, previamente funcionalizada. Esta etapa se lleva a cabo en dos pasos: en el primero (figura 3A), la superficie de trabajo del electrodo serigrafiado previamente activada (1 en figura 1) y funcionalizada a escala nanométrica con grupos arilamina, (2 en figura 2 y 1 en figura 3A) se incuba con 50 µL de una disolución de glutaraldehído, GLU (2 en figura 3A), agente químico bifuncional como intermedio de enlace, al 5 % en tampón fosfato, PBS, de pH 7,4 durante 1 hora a 24 ºC (3 en figura 3A) y en el segundo paso (figura 3B), la plataforma base obtenida en 3 de la figura 3A (3 en la figura 3B) se incuba con 50 µL de una disolución del neurotransmisor dopamina (4 en la figura 3B) de concentración 2,2 mM en tampón fosfato, PBS, 50 mM de pH 7,4 durante 1 hora a 24 ºC (5 en figura 3B).

Figura 4.- Proceso electródico del catecol (grupo funcional terminal en la plataforma base funcionalizada) sobre electrodo serigrafiado por Voltamperometría Cíclica en tampón fosfato 50 mM de pH = 7,4 entre 0,5 V y 1,0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. La línea punteada (1 en figura 4) corresponde a SPCE – Corriente Residual, RC, en PBS 50 Mm, pH=7,4. Proceso electroquímico del Catecol, CA, (sistema hidroquinona/quinona, **2a y 2b**, respectivamente en figura 4). La línea continua (3 en figura 4) corresponde a la respuesta voltamperométrica del SPCE al Catecol, CA, 3 mM en PBS 50 Mm, pH=7,4.

Los electrodos de referencia están constituidos por la forma oxidada y reducida de un sistema redox, pe. Ag/AgCl en KCl, donde tenemos Ag^0 y Ag^+. En este electrodo solo hay Ag^0, de ahí que se califique en esta figura y en las posteriores como pseudoreferencia.

Figura 5.- Caracterización de las superficies biosensoras con el neurotransmisor dopamina terminal por Voltamperometría Cíclica en tampón fosfato 50 mM de pH = 7,4 entre 0,5 V y 1,0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. En estas condiciones, las líneas representan: **1-** Respuesta del electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado según etapa 1 en Figura 1; **2-** Respuesta de electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado y funcionalizado con arilamina según etapa 1 en Figura 1 y etapa 2 en Figura 2, respectivamente; **3-** Respuesta del electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado según etapa 1 en Figura 1, en presencia de una disolución de catecol 3 mM; **4-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas (Figuras 1, 2 y 3) (electrodo de trabajo serigrafiado DS, 0 y superficie con el neurotransmisor terminal según etapa 5 en Figura 3B) y **5-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas (Figuras 1, 2 y 3) (electrodo de trabajo serigrafiado DS, 0 y superficie con el neurotransmisor terminal según etapa 5 en Figura 3B) tras la adición de catecol 3 mM en disolución.

Figura 6.- Caracterización de las superficies biosensoras con el neurotransmisor dopamina terminal por Voltamperometría Cíclica en HCl 25 mM entre 0,5 V y 1,0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s. En estas condiciones, las líneas representan: **1-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas (Figuras 1, 2 y 3) sobre electrodo de carbono serigrafiado DS-SPCE (0) (superficie con el neurotransmisor terminal según etapa 5 en Figura 3B) en ausencia (**1a**) y en presencia (**1b**) de catecol 3 mM en disolución; **2-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas (Figuras 1, 2 y 3) sobre electrodo de carbono, modificado con MWCNTs (nanotubos de carbono) serigrafiado DS (0) (superficie con el neurotransmisor terminal según etapa 5 en Figura 3B) en ausencia (**2a**) y en presencia (**2b**) de catecol 3 mM en disolución.

Figura 7.- Procedimiento de caracterización de las superficies biosensoras con el neurotransmisor dopamina terminal por Voltamperometría Cíclica, junto al detalle de las estructuras ancladas en cada etapa, utilizando Hexacianoferrato (III), $Fe(CN)_6^{3-}$, como sonda electroactiva o redox, sobre **1-** superficie del electrodo serigrafiado DS activada según etapa 1 en Figura 1; **2-** superficie del electrodo serigrafiado DS funcionalizada según etapa 2 en Figura 2; **3-** superficie del electrodo serigrafiado DS funcionalizada y con el agente bifuncional inmovilizado según etapa 3 en Figura 3A y, finalmente, **4-** superficie del electrodo serigrafiado DS con el neurotransmisor dopamina terminal según etapa 5 en Figura 3B.

Figura 8.- Caracterización de las superficies biosensoras con el neurotransmisor dopamina terminal por Voltamperometría Cíclica, utilizando Hexacianoferrato (III), $Fe(CN)_6^{3-}$, como sonda electroactiva o redox en HCl 25 mM entre 0,5 V y -0,5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s, siguiendo las etapas de la Figura 7. Las líneas representan: **1-** respuesta obtenida de la sonda redox sobre la superficie del electrodo serigrafiado DS activada según etapa 1 en Figura 1; **2-** respuesta obtenida de la sonda redox sobre la superficie del electrodo serigrafiado DS funcionalizada según etapa 2 en Figura 2 y Figura 7; **3-**superficie del electrodo serigrafiado DS funcionalizada y con el agente bifuncional inmovilizado según etapa 3 en Figura 3A y Figura 7; **4-** respuesta obtenida de la sonda redox sobre la superficie del electrodo serigrafiado DS con el neurotransmisor dopamina terminal según etapa 5 en Figura 3B y 4 en Figura 7, donde el pico catódico **a** corresponde a la reducción de la función benzoquinona presente sobre la superfice y el pico catódico **b** a la reducción de la sonda redox, y, finalmente, **5-** respuesta obtenida sobre la superficie del electrodo serigrafiado DS sin funcionalizar y con el neurotransmisor dopamina terminal según etapa 3 en la Figura 3B de la sonda electroactiva, eliminando solo la etapa 2 en el procedimiento de caracterización (Figura 7), con la dopamina inmovilizada por enlace covalente al gluraldehído adsorbido directamente sobre la superficie del electrodo SPCE, previamente activada, según las etapas recogidas en las Figuras 1 y 3 del procedimiento descrito en la presente invención.

Figura 9.- Caracterización de las superficies biosensoras con el neurotransmisor dopamina terminal por Voltamperometría Cíclica, utilizando Hexacianoferrato (III), $Fe(CN)_6^{3-}$, como sonda electroactiva o redox en PBS 50 mM entre -0,5 V y 0,5 V (líneas continuas) y 0,5 V y -0,5 V (líneas punteadas) a una velocidad de barrido de 100 mV/s, siguiendo las etapas de la Figura 7. En estas condiciones, las líneas representan: **1-** Respuesta del electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado según etapa 1 en Figura 1 a la sonda electroactiva (1 en Figura 7), iniciando el barrido a E_i – 0.5 V (línea continua en A y B) y a E_i 0.5 V (línea punteada en A); **2-** Respuesta de electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado y funcionalizado con arilamina según etapa 1 en Figura 1 y etapa 2 en Figura 2, respectivamente, a la sonda electroactiva (2 en Figura 7), iniciando el barrido a E_i –0.5 V (línea continua en A y B) y a E_i 0.5 V (línea punteada en A); **3-** Respuesta del electrodo de trabajo serigrafiado DS, activado según etapa 1 en Figura 1, funcionalizado según etapa 2 en Figura 2 e incubado con glutaraldehído según etapa 3 en Figura 3A, a la sonda electroactiva (3 en Figura 7), iniciando el barrido a E_i –0.5 V (línea continua en A y B) y a E_i 0.5 V (línea punteada

en A); **4-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas descritas en el procedimiento de la invención (Figuras 1, 2 y 3) (electrodo de trabajo serigrafiado DS, 0), a la sonda electroactiva (4 en Figura 7) iniciando el barrido a Ei –0.5 V (línea continua en B); **5-** Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada, según las tres etapas descritas en el procedimiento de la invención (Figuras 1, 2 y 3) (electrodo de trabajo serigrafiado DS, 0), a la sonda electroactiva (4 en Figura 7) iniciando el barrido a Ei 0.5 V (línea punteada en B) y, finalmente, **6-** Respuesta de la plataforma base sin funcionalizar (eliminando solo la etapa 2 del procedimiento de caracterización en Figura 7) con la dopamina inmovilizada por enlace covalente al gluraldehido adsorbido directamente sobre la superficie del electrodo SPCE, previamente activada, según las etapas recogidas en las Figuras 1 y 3 del procedimiento descrito en la presente invención, iniciando el barrido a Ei - 0.5 V (línea continua en B).

Figura 10.- Voltamperogramas Cíclicos en el proceso de funcionalización de los electrodos serigrafiados DS, activados según etapa 1 en Figura 1 y registrados a 100 mV/s, en presencia de los precursores: **A-** ion 4-Nitrobencenodiazonio 2 mM en medio ácido 25 mM y **B-** 4-Nitroanilina 2mM, a partir de esta amina aromática se genera *in situ* el ion 4.Nitrobencenodiazonio por la reacción de diazotación en HCl 1M y nitrito sódico, $NaNO_2$, de concentración 6%. Se incluyen los 5 ciclos que se precisan para la funcionalización, siendo el primero de ellos la línea continua en ambas gráficas A y B de esta figura, donde **a** es la señal en el proceso de reducción del grupo diazonio y generación del radical arilo y **b** es la señal en el proceso de reducción del grupo nitro a amino, dando lugar a la funcionalización de la superficie con grupos arilamina.

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Funcionalización de la superficie de trabajo del electrodo serigrafiado DS: Procedimiento de obtención de la superficie catalítica.

Se activa el electrodo con 50 µL de una disolución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de concentración 0,1 M por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0,5 V y -1,5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos (Fig 1). A continuación y una vez lavado el electrodo, se dispensan 50 µL de una disolución de 4-

Nitrobencenodiazonio Tetrafluorborato (4-NitroBD$^+$ o pNBD), monómero funcional seleccionado como precursor, de concentración 2 mM (1) en HCl 25 mM por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0.5 V y –1.0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos para funcionalizar la superficie activada previamente (Fig. 2 y Fig. 10A). En el primer ciclo se produce, simultáneamente, el radical arilo que se injerta en el electrodo (2 en Figura 2 y pico de reducción a 0V. en Fig. 10A) con la pérdida de una molécula de nitrógeno (N_2) del ion diazonio durante la formación de enlace con la superficie del electrodo serigrafiado y, posteriomente, la reducción electroquímica del grupo funcional nitro (-NO_2) (1 en Figura 2) para dar lugar al grupo funcional amino (-NH_2) (3 en Figura 2 y onda a –0.8 V. en Fig.10A), quedando la superficie del electrodo funcionalizada a escala nanométrica con grupos arilamina. Tras un lavado con HCl 25 mM y seco, el electrodo serigrafiado DS funcionalizado (2 en Figura 2) se somete a la última etapa del procedimiento de la invención, la inmovilización del neurotransmisor dopamina, DA (Figura 3). La segunda monocapa, sobre la primera autoensamblada con funcionalidades arilamina (1 en Figura 3A), se consigue por inmovilización del glutaraldehído, GLU (2 en Figura 3A), al 5% en PBS 50 mM pH=7,4 mediante incubación de 1 hora a 24 ºC (3 en Figura 3A y 3B). Antes de proceder con el segundo paso de esta etapa y terminado el periodo de incubación, se lava con PBS 50 mM de pH=7,4 en exceso. La dopamina (4 en Figura 3B) se incuba durante 1 hora en condiciones experimentales próximas a las fisiológicas y, finalizado dicho periodo de incubación, se procede a lavar la plataforma funcionalizada con las tres capas autoensambladas (5 en Figura 3B) con PBS 50 mM de pH=7,4, con objeto de eliminar toda la dopamina no unida por enlace covalente a la plataforma base funcionalizada.

<u>Ejemplo 2:</u> Caracterización de Superficies Sensoras: Sistema Hidroquinona/ Quinona

A) Respuesta del electrodo serigrafiado al catecol en disolución.

El proceso de oxidación puede considerarse quasi-reversible (2 en Figura 4), con el intercambio de 2 protones y 2 electrones, donde la diferencia entre el potencial de pico anódico b (0,238 V) y pico catódico a (- 0,057 V) es de 280 mV (potencial formal, $E^{o\prime}$= 140 mV) y la razón de intensidades de pico es de 1,4.

B) Respuesta del neurotransmisor dopamina inmovilizado en la plataforma base en tampón PBS y pH fisiológico.

El extremo de las capas autoensambladas con la inmovilización de la dopamina, tal y como se ha descrito anteriormente (5 en Figura 3B), presenta la estructura del catecol, cuya respuesta al proceso de oxidación se muestra en la Figura 5 y los datos extraídos se recogen en la Tabla 1. En ella se ilustra como la señal de la oxidación de la dopamina inmovilizada sobre la plataforma base (4 en Figura 5) comienza a un potencial de -0.1 V y alcanza un máximo (pre-onda) a un potencial de 0,108 V de 150 μA, un segundo máximo a 0,200 V de 162 μA y un tercer máximo a un potencial de 0,459 V de 140 μA, no observándose ningún pico de reducción en el barrido de vuelta, siendo el proceso irreversible.

Tabla 1

Datos extraídos de la Figura 5: Caracterización y Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS en PBS 50 mM pH 7,4								
Voltamperogramas cíclicos registrados iniciando el barrido a E_i - 0,5 V								
PBS pH 7,4	**Pre-onda, E_{pa}, V**	**E_{pa}, V**	**E_{pa}, V**	**E_{pc}, V**	**Pre-onda, i_{pa}, μA**	**i_{pa}, μA**	**i_{pa}, μA**	**i_{pc}, μA**
3	-	0,238	-	- 0,054	-	73,33	-	- 50,00
4	0,108	0,200	0,454	-	150,0	161,7	140,0	-
5	-	0,319	-	- 0,070	-	150,0	-	- 90,00
Datos extraídos de la Figura 6: Caracterización y Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS y SPCE-MWCNTs-DS en HCl 25 mM								
Voltamperogramas cíclicos registrados iniciando el barrido a E_i - 0,5 V								
HCl 25 mM	**Pre-onda, E_{pa}, V**	**E_{pa}, V**	**E_{pa}, V**	**E_{pc}, V**	**Pre-onda, i_{pa}, μA**	**i_{pa}, μA**	**i_{pa}, μA**	**i_{pc}, μA**
1a	0,475	0,555	-	-	76,20	90,50	-	-
1b	-	0,606	-	0,187	-	114,3	-	- 14,70
2a	-	0,586	-	-	-	185,7	-	-
2b	-	0,525	-	0,257	-	152,4	-	- 100,0

Un análisis comparativo de la señal 4 descrita en la Figura 5 con la señal obtenida del catecol en disolución (3 en Figura 4 y en Figura 5 para una mejor comparación) denota una disminución muy significativa del potencial en 130 mV y un aumento del 55% de la señal, como consecuencia de la unión covalente entre las diferentes capas autoensambladas a la superficie que favorece la transferencia electrónica directa y no permite recuperar el catecol (autoensamblado), quedando las superficies

funcionalizadas al extremo con grupos quinonas dirigidos hacia el seno de la disolución.

La adición de catecol en concentración 3 mM en disolución (5 en Figura 5), sobre la plataforma base funcionalizada con grupos extremos benzoquinona, da lugar a la respuesta característica del proceso electródico del catecol, con una diferencia entre el potencial de pico anódico (0,319 V) y pico catódico (-0,070 V) de 389 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 194 mV) y una razón entre las intensidades de pico de 1,67, por lo que ha aumentado la irreversibilidad del sistema al mismo tiempo que las intensidades de pico de ambos procesos en un 50%, ejerciendo dicha superficie un efecto catalítico sobre el catecol, tanto en el proceso de oxidación como en el de reducción.

C) Respuesta del neurotransmisor dopamina inmovilizado en la plataforma base en medio ácido con HCl 25 mM.

La morfología de las curvas voltamperométricas es similar a las obtenidas en la caracterización de las plataformas funcionalizadas con la dopamina inmovilizada ilustrada en el apartado B). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6 y Tabla 1 para dos electrodos serigrafiados diferentes: 1- electrodo serigrafiado de carbono (SPCE-DS) y 2- electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanotubos de carbono multipared (SPCE-MWCNTs-DS) con grupos ácidos.

Se puede observar que la señal irreversible de la dopamina inmovilizada sobre la plataforma base funcionarizada sobre los electrodos serigrafiados DS de carbono modificada con MWCNTs (2a en Figura 6) presenta una intensidad de pico doble a la obtenida con la plataforma base funcionalizada sobre los electrodos serigrafiados de carbono DS sin modificar con MWCNTs (1a en Figura 6). Este hecho sugiere que la actividad catalítica de los grupos extremos de la plataforma base modificada con el catecol se suma a la actividad catalítica, demostrada en otros casos, que presentan los nanotubos de carbono.

La adición de catecol en concentración 3 mM en disolución (1b-SPCE-DS y 2b-SPCE-MWCNTs-DS en Figura 6), sobre la plataforma base funcionalizada con grupos extremos benzoquinona sobre cada uno de los dos electrodos serigrafiados, da lugar a la respuesta característica del proceso electródico del catecol.

Para la plataforma base funcionalizada y con la dopamina inmovilizada sobre el electrodo SPCE-DS activado, la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,555 V) y pico catódico (0,187 V) es de 368 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 184 mV) y la razón

entre las intensidades de pico de 1,6, por lo que el sistema muestra una irreversibilidad parecida al comparar con los resultados obtenidos en tampón PBS y pH fisiológico para el mismo electrodo (Figura 5), aunque ha disminuido el efecto catalítico de dicha superficie hacia el catecol. Para la plataforma base con el electrodo SPCE-MWCNTs-DS, la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,525 V) y pico catódico (0,257 V) es de 268 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 134 mV) y la razón entre las intensidades de pico de 1,5, por lo que el sistema se hace más reversible al mismo tiempo que las intensidades de pico de ambos procesos aumentan, ejerciendo dicha superficie un efecto catalítico sobre el catecol, tanto en el proceso de oxidación (en un 70%) como en el de reducción (en un 50%), si se compara con los resultados obtenidos en este mismo medio HCl con la plataforma base funcionalizada y con la dopamina inmovilizada sobre el electrodo SPCE--DS sin modificar con los MWCNTs.

Ejemplo 3: Caracterización y respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS a la sonda electroactiva o redox.

A) La caracterización de estas superficies se ha empleado el sistema redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (mediador implicado en muchas reacciones enzimáticas de interés biológico) como sonda electroactiva, registrando su respuesta en cada una de las etapas del procedimiento descrito en esta invención y recogidas en las Fig. 1, 2 y 3.

Previamente a registrar el voltamperograma cíclico de la sonda electroactiva en cada una de las etapas, el electrodo serigrafiado DS fue lavado de forma secuencial con H_2SO_4 0,1M, HCl 25 mM y dos veces con PBS 50 mM pH 7,4.

Para conocer mejor el alcance de la invención se han introducido a modo comparativo las señales analíticas obtenidas de la sonda electroactiva eliminando la etapa 2 del procedimiento de caracterización en Figura 7; esto es, eliminando la etapa de funcionalización (2 en Figura 2), con lo que no está injertada la función arilamina sobre la superficie. El agente químico bifuncional como intermedio de enlace se ha inmovilizado directamente por adsorción a la superficie del electrodo serigrafiado DS, previamente activado según etapa 1 en Figura 1 y 7, y la dopamina se ha inmovilizado siguiendo el procedimiento descrito en la etapa 3B de la Figura 3. Las respuestas de la sonda electroactiva o redox se ilustran en 5 de la Figura 8 y en 6 de la Figura 9, para los dos medios ensayados, HCl 25 mM y PBS 50 mM pH 7,4, respectivamente.

B) Caracterización y respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS a la sonda electroactiva en medio ácido con HCl 25 mM (Figura 8 y Tabla 2).

Tabla 2

Datos extraídos de la Figura 8: Caracterización y Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS en HCl 25 mM a la sonda electroactiva, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, según procedimiento descrito en la Figura 7								
Voltamperogramas cíclicos registrados iniciando el barrido a E_i 0,5 V								
HCl 25 mM	**Post-onda, V**	**$E_{pa}c$, V**	**E_{pc},a, V**	**$E_{pc}b$, V**	**Post-onda, µA**	**$i_{pa}c$, µA**	**$i_{pc}a$, µA**	**$i_{pc}b$, µA**
1	-	0,208	-	0,136	-	45,28	-	- 41,51
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	0,183	-	0,102	-	41,51	-	- 41,51
4	-	0,157	0,200	0,072	150,0	100,0	- 109,4	- 113,2
5	0,442	0,153	0,255	0,081	166,0	150,0	- 73,58	- 90,00
Datos extraídos de la Figura 9: Caracterización y Respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS en PBS 50 mM pH 7,4 a la sonda electroactiva, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, según procedimiento descrito en la Figura 7								
Voltamperogramas cíclicos registrados iniciando el barrido a E_i – 0,5 V (Línea continua)								
PBS pH 7,4	**Post-onda, V**	**$E_{pa}c$, V**	**$E_{pa}a$, V**	**$E_{pc}b$, V**	**Post-onda, µA**	**$i_{pa}c$, µA**	**$i_{pa}a$, µA**	**$i_{pc}b$, µA**
1	-	0,168	-	0,052	-	22,42	-	- 20,00
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	0,128	-	0,040	-	185,7	-	- 18,79

4	-	0,218	-	- 0,059	-	316,7	-	- 100,0
6	-	0,285	-	0,017	-	375,0	-	- 125,0
Voltamperogramas cíclicos registrados iniciando el barrido a E_i 0,5 V (Línea punteada)								
1	-	0,168	-	0,000	-	20,46	-	- 19,4
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	0,128	-	0,052	-	15,76	-	- 15,76
5	-	0,191	-	- 0,059	-	158,3	-	175,0

El proceso electródico de la sonda electroactiva, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (0), puede considerarse reversible (1 en Figura 8) sobre el electrodo activado según etapa 1 de Figura 7, con el intercambio de 1 electrón, donde la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,208 V) y pico catódico (0,136 V) es de 72 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 36 mV) y la razón de intensidades de pico es de 1,1.

Al funcionalizar el electrodo según etapa 2 de Figura 7, se observa que la respuesta de la sonda electroactiva desaparece por completo (2 en Figura 8), lo cual demuestra, por un lado, que la superficie conductora del SPCE-DS activado se ha convertido en aislante y, por otro, que dicha superficie se ha funcionalizado por completo a escala nanométrica con grupos arilamina, procedentes del injerto superficial de los radicales generados en la reducción del precursor, el ion 4-NitroBD$^+$ (pNBD).

La señal de la sonda electroactiva, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (0), se recupera cuando la plataforma base funcionalizada a escala nanométrica con grupos arilamina se incuba con el glutaraldehído (3 en Figuras 7 y 8), siendo de nuevo una superficie conductora y observándose un desplazamiento de los picos anódico y catódico hacia valores más negativos producido por la catálisis de los grupos cetónicos del glutaraldehído dirigidos hacia el seno de la disolución (3a en Figura 3 y 3 en Figura 7) y un proceso electródico que puede considerarse reversible, donde la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,183 V) y pico catódico (0,102 V) es de 80 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 40 mV) y la razón de intensidades de pico es de 1,0.

La plataforma base funcionalizada con el neurotransmisor dopamina inmovilizado (4 en Figura 7 y 8) presenta unas propiedades catalíticas excepcionales, debido a los grupos benzoquinona procedentes de la oxidación del catecol (Figura 4), grupo extremo de la plataforma base con monocapas autoensambladas, tal y como se

describe en el ejemplo 1, cuyo proceso de reducción aparece a 0,200 V (4a en Figura 8). Esta catálisis provoca un desplazamiento de los picos anódico (4 en Figura 8) y catódico (4b en Figura 8) hacia valores más negativos en 50 mV y 64 mV, respectivamente, al mismo tiempo que un incremento de tres veces en los valores de intensidad de ambos picos del proceso electródico comparado con los valores obtenidos sobre el SPCE-DS activado (1 en Figura 8). El proceso electródico de la sonda se puede considerar quasi-reversible, donde la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,157 V) y pico catódico (0,072 V) es de 85 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 42,5 mV) y la razón de intensidades de pico es de 0,88.

C) Caracterización y respuesta de la plataforma base funcionalizada con la dopamina inmovilizada sobre SPCE-DS a la sonda electroactiva en PBS 50 mM y pH fisiológico (Figura 9 y Tabla 2).

La Figura 9A ilustra, para una mayor claridad, las tres primeras etapas del procedimiento de caracterización y respuesta de la sonda electroactiva en disolución, recogiendo los voltamperogramas cíclicos de la misma a dos potenciales iniciales, E_i, diferentes: -0,5 V (líneas continuas) y 0,5 V (líneas punteadas). En la Figura 9B se muestran los voltamperogramas cíclicos de la sonda electroactiva en disolución obtenidos en todas las etapas (Figura 7) a un E_i de -0,5 V, incluido, a modo comparativo, el voltamperograma de la sonda con la plataforma base sin funcionalizar y con la dopamina inmovilizada (6 en Fig.9A), descrito en el apartado A) Procedimiento de caracterización.

El proceso electródico de la sonda electroactiva, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (0), puede considerarse quasi-reversible (1 en Figura 9) sobre el electrodo activado según etapa 1 de Figura 7, con el intercambio de 1 electrón, donde la diferencia entre el potencial de pico anódico (0,168 V) y pico catódico (0,052 V) es de 116 mV (potencial formal, $E^{o'}$= 58 mV) y la razón de intensidades de pico es de 1,1, iniciando el barrido a un E_i de -0.5 V (1-línea continua en Figura 9A). Al invertir el barrido de potenciales para registrar la señal de la sonda, iniciándose a un E_i de 0,5 V (1-línea punteada en Figura 9A), no se observa prácticamente ninguna modificación en el proceso electródico. La intensidad de corriente, tanto del pico anódico como catódico de la sonda en este electrolito, se ha reducido a la mitad, si se compara con la obtenida en HCl 25 mM e iniciándose el barrido cíclico al mismo E_i (Tabla 2).

La funcionalización de la superficie del SPCE-DS activada (2 en Figuras 7 y 9) a escala nanométrica con grupos arilamina, provoca la desaparición completa de la

señal de la sonda electroactiva en disolución PBS 50 mM pH 7,4, siendo la respuesta independiente del potencial inicial elegido, de la dirección del barrido de potenciales y del medio (2 en Figura 8). Esta desaparición de la señal demuestra, en primer lugar, que la superficie conductora del SPCE-DS activado se ha convertido en no conductora y, en segundo lugar, que dicha superficie se ha funcionalizado por completo a escala nanométrica con grupos arilamina, procedentes del injerto superficial de los radicales generados en la reducción del precursor, el ion 4-NitroBD$^+$ (pNBD), recubriéndose la superficie con la primera monocapa autoensamblada.

Se puede observar que, a medida que aumenta el pH y el número de capas autoensambladas, aumenta la señal de los picos anódico y catódico de la sonda electroactiva al mismo tiempo que el pico catódico se desplaza hacia valores más negativos (60 mV). Este hecho sugiere que al aumentar estas señales, siendo hasta 10 veces más sensibles, y al desplazarse las mismas, siendo más selectiva, aumenta la catálisis por efecto del grupo extremo, catecol/benzoquinona, presente en el extremo de las capas autoensambladas de la plataforma base y dirigido hacia el seno de la disolución, lo que ratifica que la actividad catalítica es mayor en condiciones cercanas a las fisiológicas, PBS 50 mM pH 7,4 y temperatura 25 ºC. Esta conclusión favorece la utilización de la sonda como mediador para determinar la biomolécula generada, sea H_2O_2 o NADH, en un ensayo de enzimático.

Ejemplo 4: Funcionalización de la superficie de trabajo del electrodo serigrafiado DS: Comparativa de precursores en la obtención de superficies funcionalizadas

Se activa el electrodo con 50 µL de una disolución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de concentración 0,1 M por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0,5 V y -1,5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos (Fig 1). A continuación y una vez lavado el electrodo, se dispensan 50 µL de una disolución de 4-Nitrobencenodiazonio Tetrafluorborato (4-NitroBD$^+$ o pNBD), monómero funcional seleccionado como precursor (1 en Fig. 2), de concentración 2 mM (1) en HCl 25 mM y se procede a la funcionalización de la superficie activada previamente (Fig. 10A) por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0.5 V y –1.0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos. En otro electrodo, aplicando la misma activación y el proceso de lavado del mismo, se dispensan 25 µL de una disolución de 4-Nitroanilina, monómero funcional seleccionado como precursor (0 en Fig. 2), de concentración 4 mM en HCl 2M y otros 25 µL de una disolución de nitrito sódico, $NaNO_2$, de concentración 12%, para que en los 50 µL las concentraciones de 4-

Nitroanilina, HCl y $NaNO_2$ sean de 2 mM, 1 M y 6%, respectivamente. En estas condiciones, se mantiene el electrodo durante 20 min a 4 ºC, produciéndose la diazotación del grupo amino de la anilina y, a continuación, el ion 4-Nitrobencenodiazonio (4-NitroBD$^+$) generado *in situ* se usa para la funcionalización de la superficie del electrodo previamente activada por Voltamperometría Cíclica (CV) entre 0.5 V y –1.0 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un número total de 5 ciclos (Fig. 10B). Ambos precursores generan, en el primer ciclo, un pico de reducción a potenciales de 0 V (**a** en figura 10A y 10B ciclo1º-línea continua) como consecuencia de producirse electroquímicamente el radical arilo que se injerta en el electrodo al perder, simultáneamente, una molécula de nitrógeno (N_2). La reducción electroquímica a –0.8 V (**b** en figura 10A y 10B ciclo1º-línea continua) del grupo funcional nitro (-NO_2) (1 en Figura 2) para dar lugar al grupo funcional amino (-NH_2) (3 en Figura 2), da lugar a que la superficie del electrodo quede funcionalizada a escala nanométrica con grupos arilamina. En los sucesivos ciclos (ciclos del 2º al 5º), el pico de reducción a 0 V desaparece (Figura 10A y 10B), constatando la pasivación de la superficie del electrodo por el injerto del film orgánico, así como la reducción completa del grupo nitro a grupo amina por la desaparición de la onda a –0.8 V.

REIVINDICACIONES

1. Superficie catalítica que comprende dopamina sobre una plataforma base funcionalizada, donde dicha plataforma base funcionalizada comprende;
   - al menos una función arilamina procedente de un ion arenodiazonio, unida a una plataforma base, y
   - glutaraldehido unido a dicha arilamina, donde se fija dicha dopamina,
   - donde dicha dopamina presenta un grupo amino unido covalentemente a dicho glutaraldehido,
   - y donde dicha plataforma base funcionalizada se caracteriza por una elevada actividad catalítica al utilizar una técnica voltamperométrica en presencia de una sonda redox, que se pone de manifiesto por un aumento de la intensidad corriente del 40-70% con respecto a la ausencia de modificación dando lugar a un aumento de sensibilidad.
2. Superficie catalítica que comprende dopamina sobre una plataforma base funcionalizada, donde dicha plataforma base funcionalizada comprende;
   - al menos una función arilamina procedente de un ion arenodiazonio, unida a una plataforma base, y
   - glutaraldehido unido a dicha arilamina, donde se fija dicha dopamina,
   - donde dicha dopamina presenta un grupo amino unido covalentemente a dicho glutaraldehido,
   - y donde dicha plataforma base funcionalizada se caracteriza por una elevada actividad catalítica al utilizar una técnica voltamperométrica en presencia de una sonda redox, que se pone de manifiesto por un desplazamiento del pico de potencial de hasta 150 mV hacia potenciales catódicos con respecto a la ausencia de modificación dando lugar a un aumento de selectividad.
3. Superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la sonda redox es el sistema hexacianoferrato (III)/hexacianoferrato (IV) y la técnica voltamperométrica es voltamperometría cíclica.
4. Superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho ion arenodiazonio procede de la sal 4-Nitrobencenodiazonio tetrafluorborato.
5. Superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho ion arenodiazonio está generado in situ por diazotación de la 4-Nitroanilina

6. Procedimiento de obtención de la superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas;
   i) activación de la superficie de un electrodo serigrafiado a escala nanométrica,
   ii) funcionalización de la superficie activada de dicho electrodo serigrafiado en presencia de monómeros funcionales de arilamina y de glutaraldehido para obtener una plataforma base funcionalizada, y
   iii) fijado de dopamina sobre dicha plataforma base funcionalizada.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en que dicha activación comprende el barrido hacia potenciales catódicos en medio ácido de la superficie de dicho electrodo serigrafiado.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 ó 7, en que dicha funcionalización comprende el anclado de iones de arenodiazonio como precursores sobre la superficie de dicho electrodo sefigrafiado activado para obtener una monocapa con grupos funcionales activos, seguido de la inmovilización sobre dicha monocapa de glutaraldehido.
9. Uso de la superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la detección clínica de metabolitos y cofactores.
10. Uso de la superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la detección de compuestos en la industria alimentaria.
11. Uso de la superficie catalítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la detección de contaminantes en el medio ambiente.

Figura 1

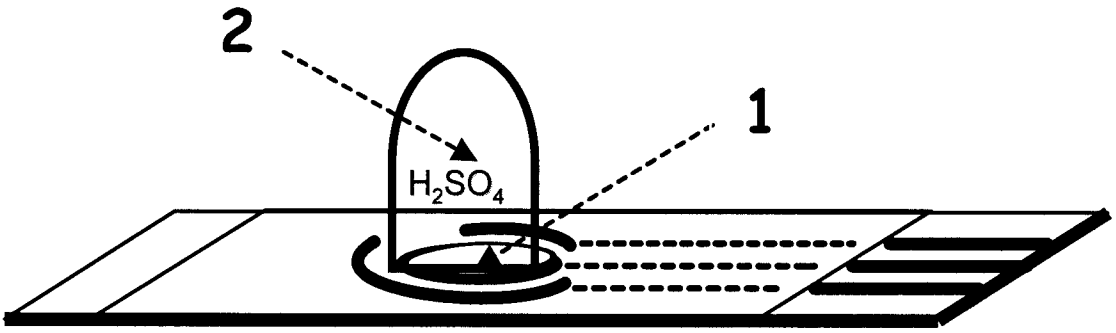


Figura 2

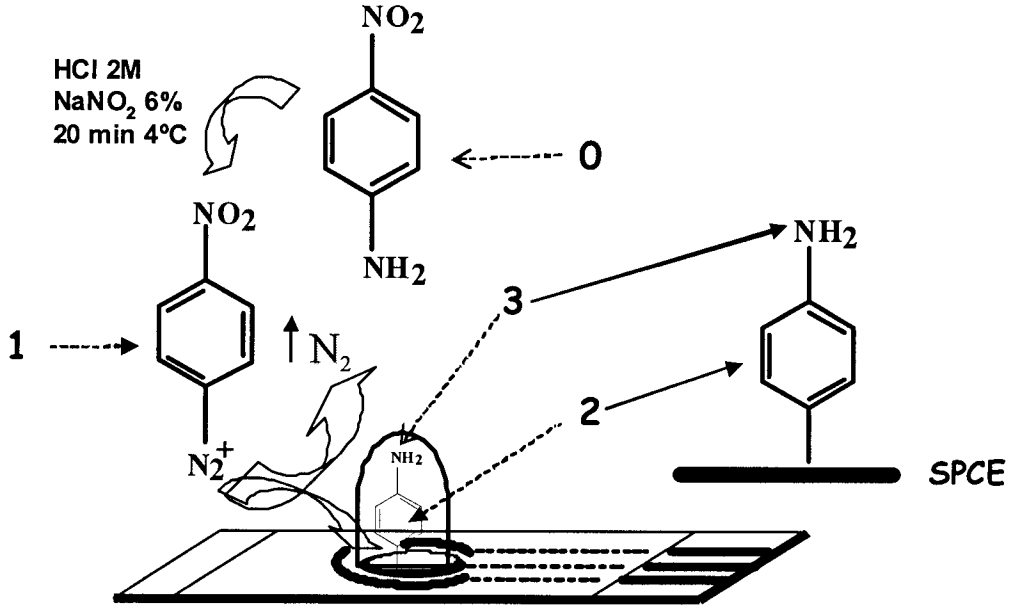


Figura 3A

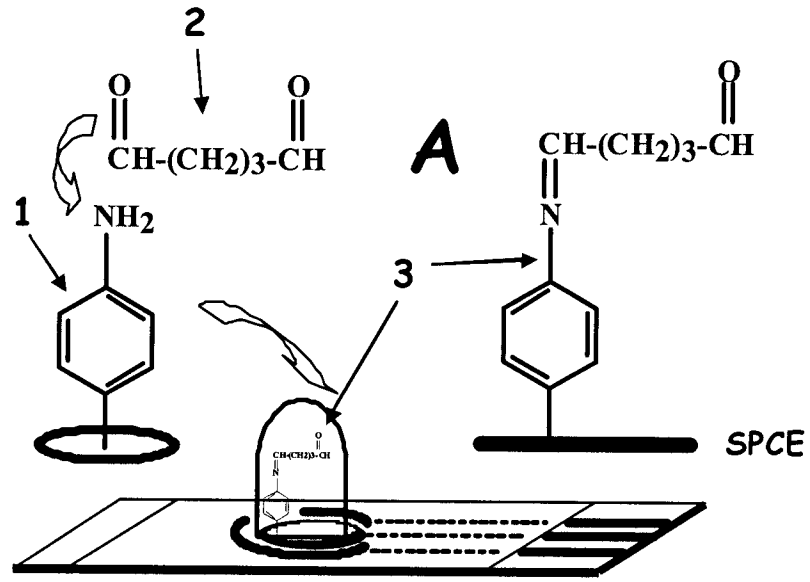


Figura 3B

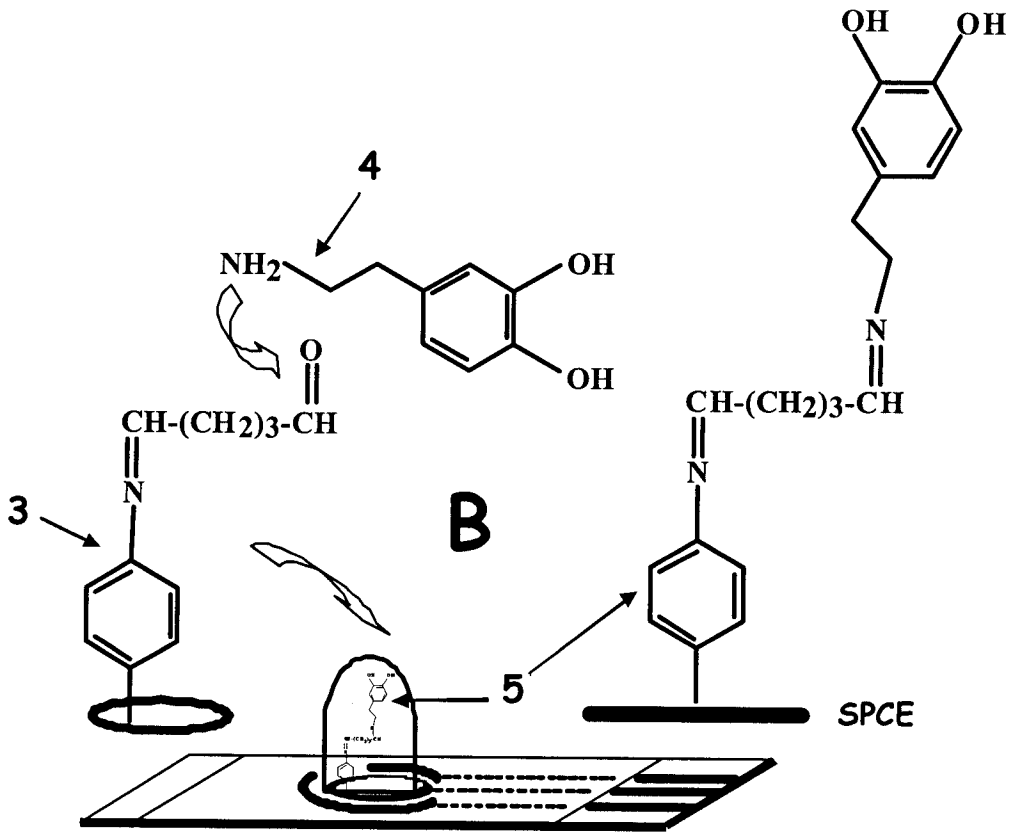


Figura 4

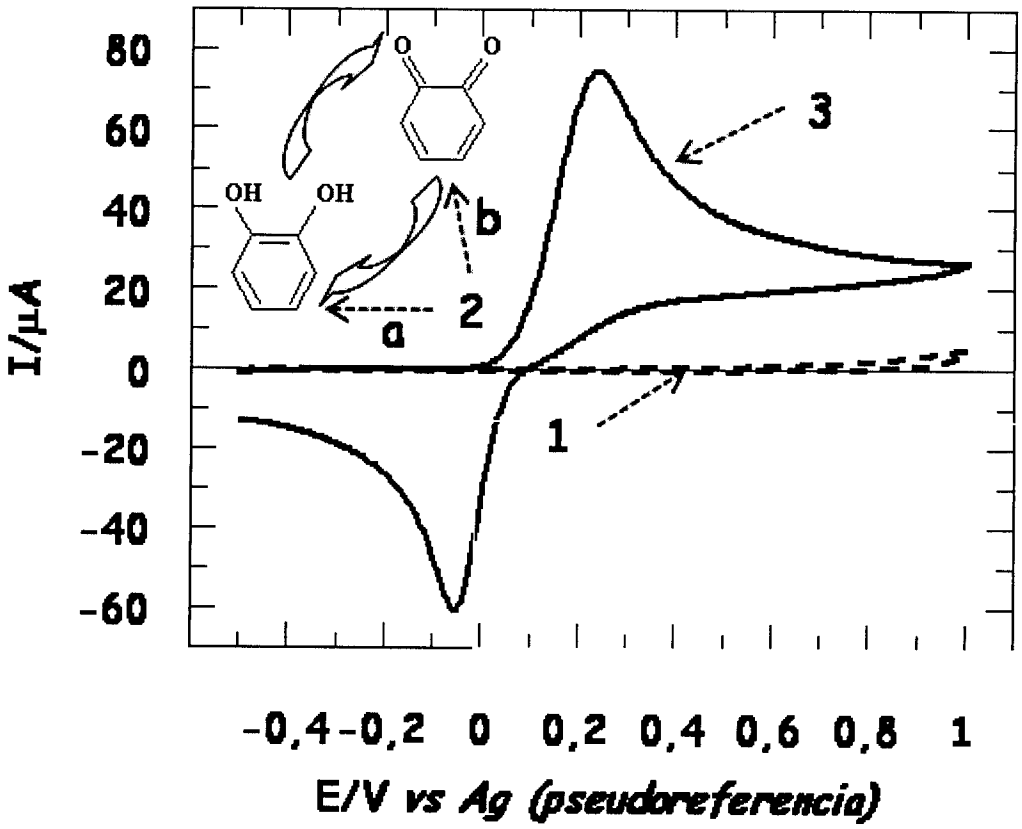

80
60
40
20
0
-20
-40
-60
I/µA
-0,4 -0,2 0 0,2 0,4 0,6 0,8 1
E/V vs Ag (pseudoreferencia)
OH
OH
O
O
a
b
1
2
3

Figura 5

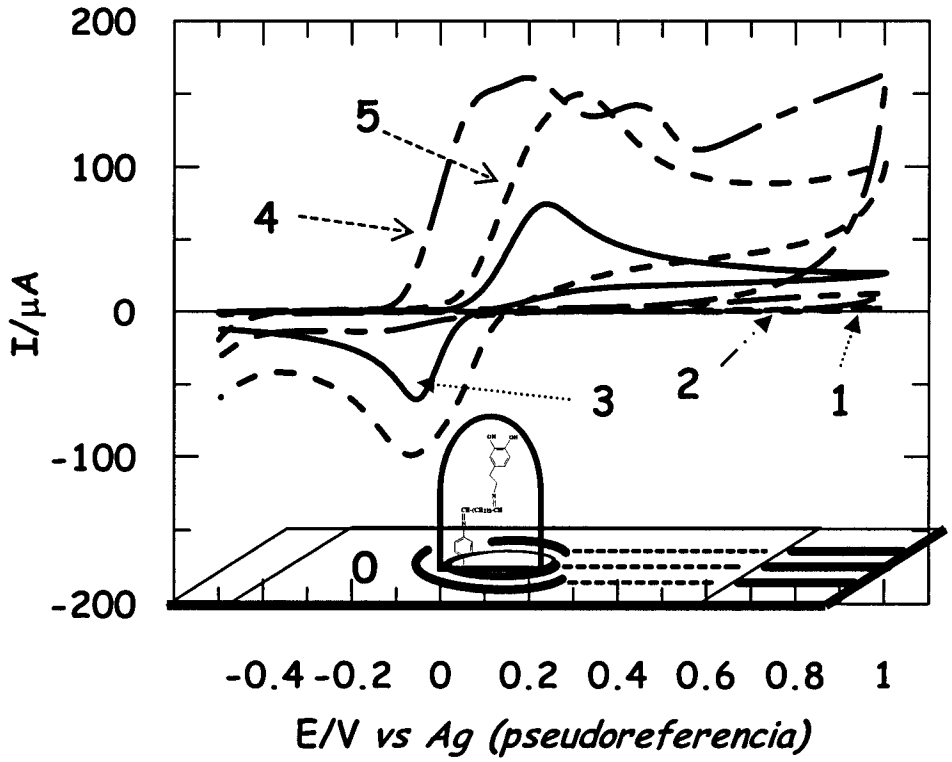

200
100
0
-100
-200
I/µA
5
4
3
2
1
0
-0.4 -0.2 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1
E/V vs Ag (pseudoreferencia)

Figura 6

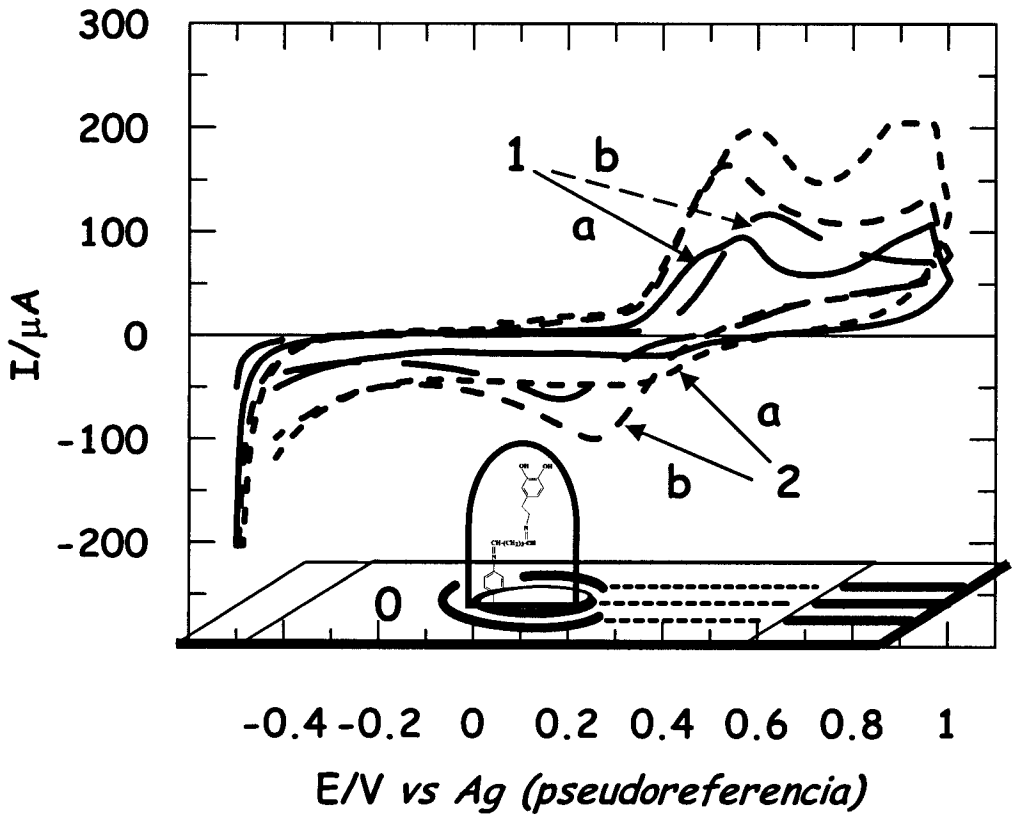

300
200
100
0
-100
-200
I/µA
1
b
a
a
b
2
0
-0.4 -0.2 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1
E/V vs Ag (pseudoreferencia)

Figura 7

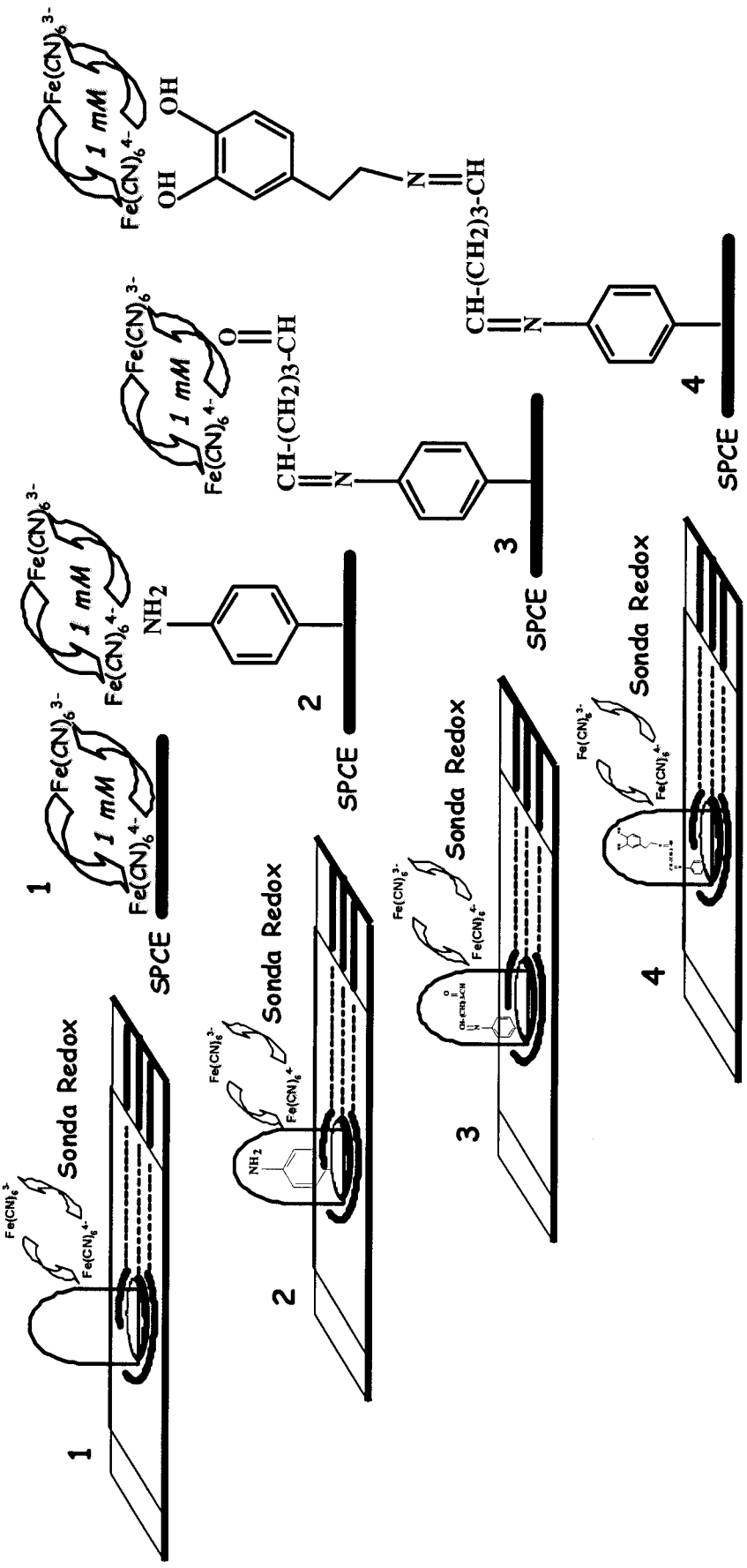


Figura 8

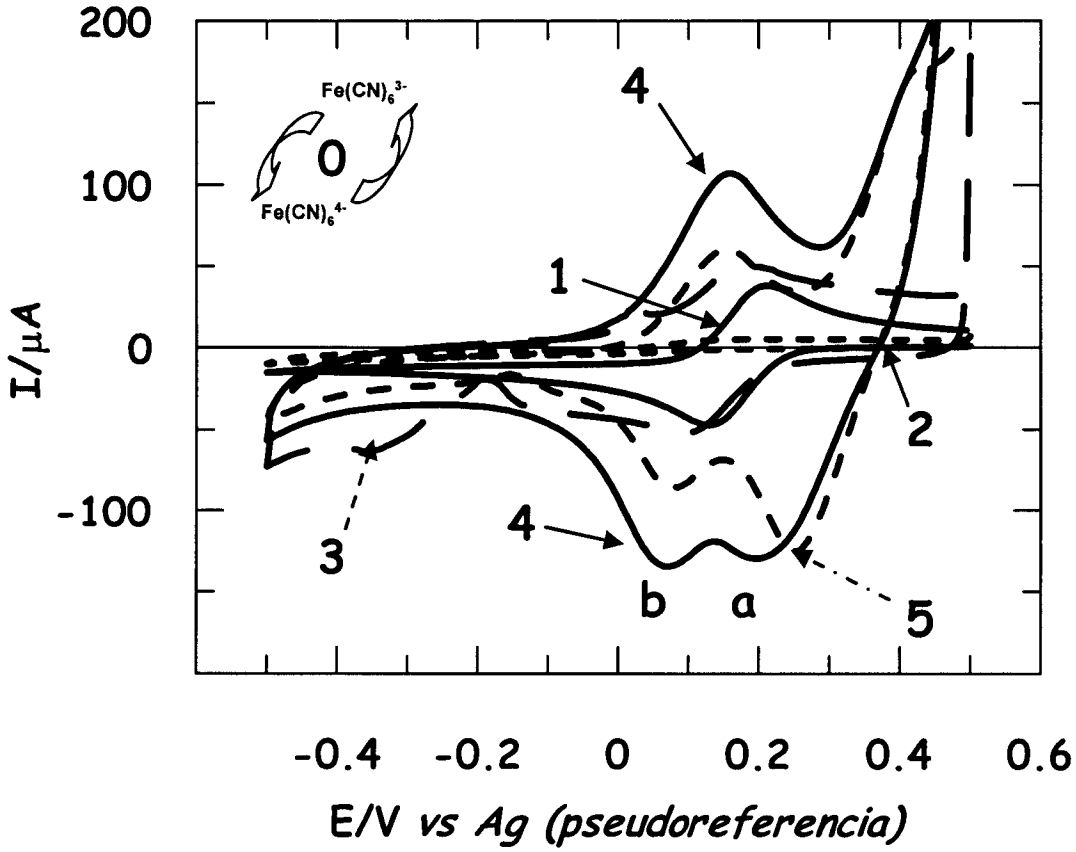

200
100
0
-100
I/μA
Fe(CN)6 3-
0
Fe(CN)6 4-
4
1
2
3
4
b
a
5
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
E/V vs Ag (pseudoreferencia)

Figura 9A

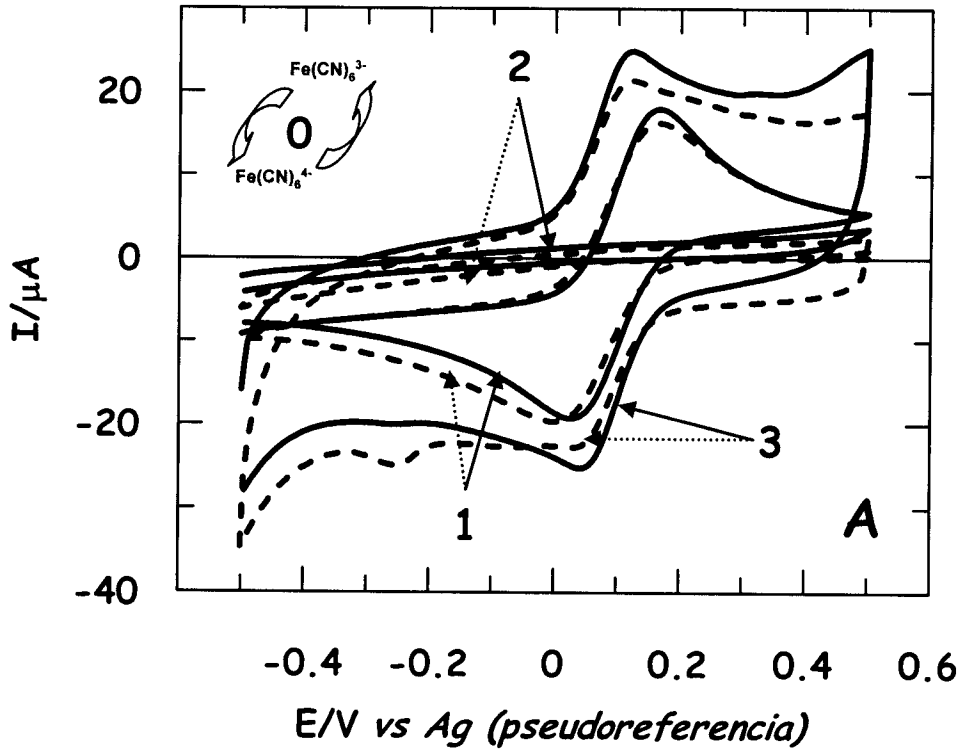


Figura 9B

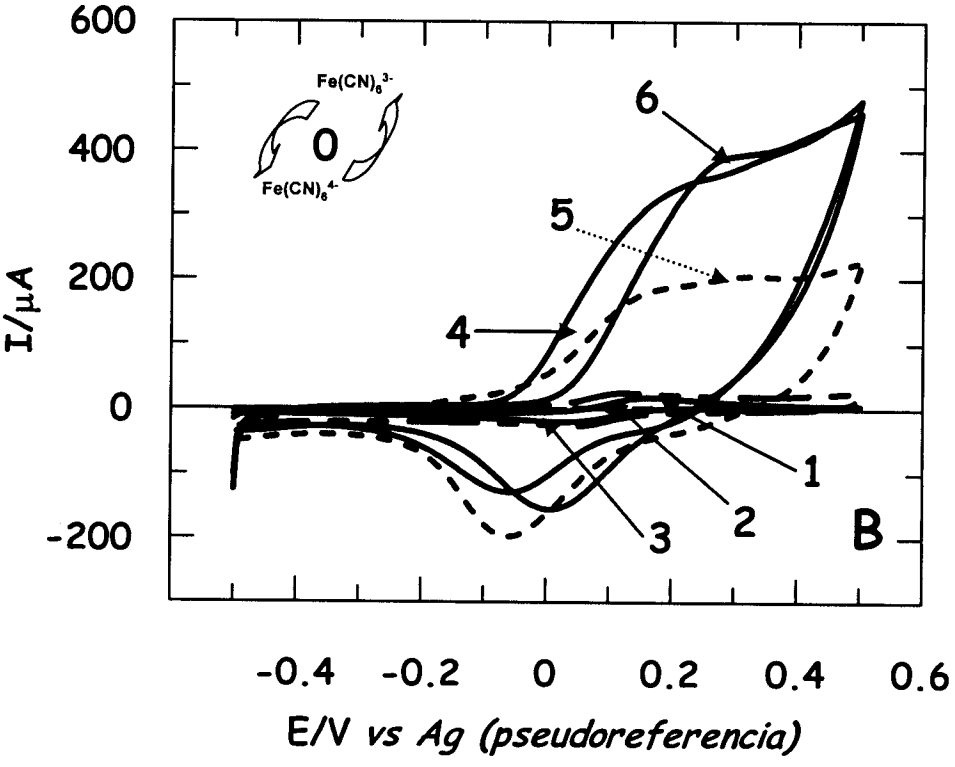


Figura 10A

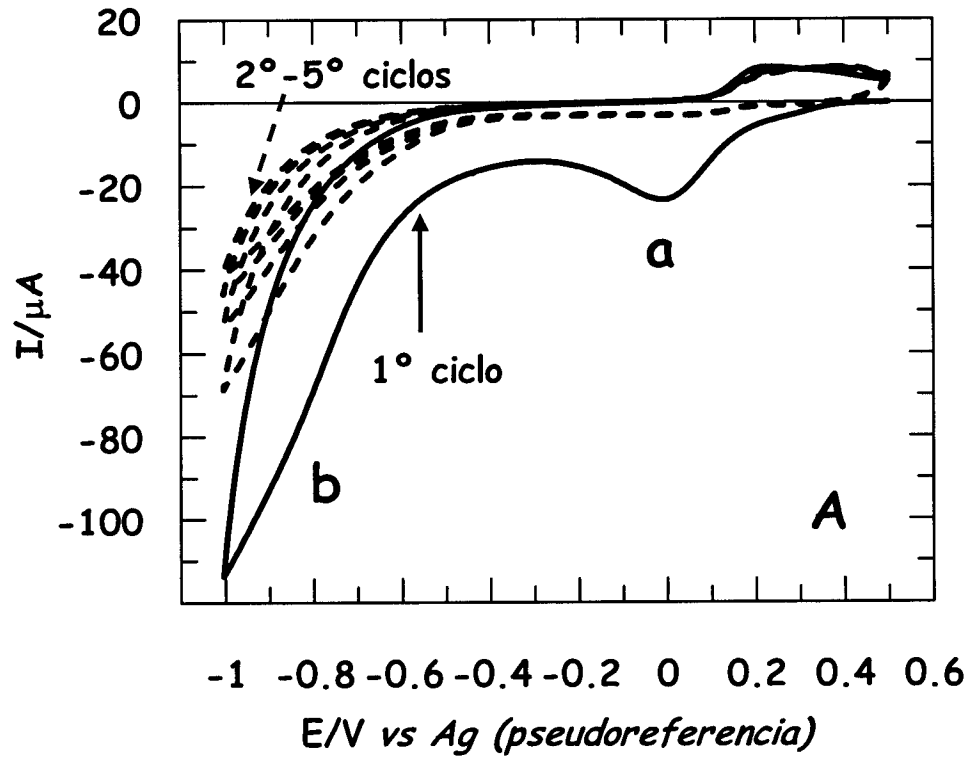
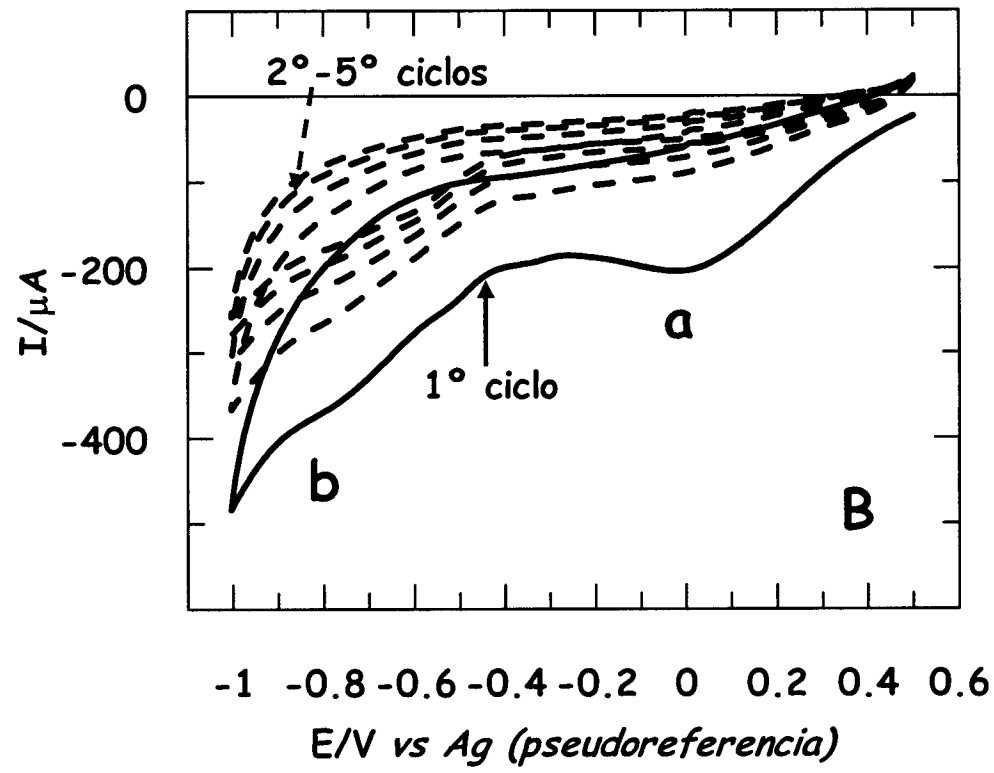


Figura 10B



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201100400

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 05.04.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	A-E. RADI et al., "An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode", Electrochimica Acta, 2009, vol. 54, nº 8, páginas 2180-2184	1,2,4-10
X	M. CORTINA-PUIG et al., "Diazonium-functionalized tyrosinase-baeds biosensor for the detection of tea polyphenols", Michochim. Acta, 2010, vol. 171, nº 1-2, páginas 187-193	1,2,4-11
X	B. D BATH et al., "Dopamine adsorption al surface modified carbon-fiber electrodes", Langmuir, 2001, vol. 17, nº 22, páginas 7032-7039	1-3
A	M. KULLAPERE et al., "Electrochemical behavior of glassy carbon electrodes modified with aryl groups", Electrochimica Acta, 2010, vol. 56, nº 1, páginas 166-173	1-12
A	Z. ÜSTÜNDAG et al., "EDTA modified glassy carbon electrode: Preparation and characterization", Electrochimica Acta, 2009, vol. 54, nº 26, páginas 6426-6432	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	**Examinador**	**Página**
22.05.2012	E. Davila Muro	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N27/327 (2006.01)
G01N33/02 (2006.01)
G01N33/48 (2006.01)
C07C245/20 (2006.01)
B01J31/06 (2006.01)
C25B11/06 (2006.01)

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

G01N, C07C, B01J, C25B

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, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,12	**SI**
	Reivindicaciones	1,2,4-11	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-12	**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	A-E. RADI et al., Electrochim. Acta, 2009, vol. 54, nº 8, pgs. 2180-2184	
D02	M. CORTINA-PUIG et al., Michochim. Acta, 2010, vol. 171,nº 1-2, pgs. 187-193	
D03	B. D BATH et al., Langmuir, 2001, vol. 17, nº 22, pgs. 7032-7039	

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 invención se refiere a una superficie catalítica que comprende un receptor biológico sobre una plataforma base funcionalizada con grupos arilamina, procedentes de iones arenodiazonio, a los cuales se une un agente de enlace químico entrecruzante (glutaraldehído) que es donde se fija el receptor biológico (dopamina). La invención también se refiere al procedimiento de obtención de la superficie catalítica, y al uso de la misma para la detección de metabolitos, cofactores, contaminantes medioambientales y compuestos de la industria alimentaria.

El documento D01 divulga un biosensor electroquímico sobre el que se inmoviliza un anticuerpo específico para la detección de toxina OTA. Se prepara utilizando un electrodo de oro (SPGE) cuya superficie se funcionaliza con grupos 4-nitrofenilo sintetizados a partir de una sal de 4-nitrofenildiazonio generada *in situ* por diazotación de 4-nitroanilina con nitrito sódico en una solución acuosa ácida. Los grupos nitro de la superficie del electrodo se someten a reducción electroquímica dando grupos amino, a continuación se lleva a cabo la activación con glutaraldehído que actúa como agente entrecruzante enlazando covalentemente con el receptor biológico, en este caso un anticuerpo de ocratoxina (OTA) y dando lugar al biosensor (ver página 2181).

El documento D02 divulga un biosensor utilizado para detección de polifenoles en la industria alimentaria. En este caso también se trata de electrodos de oro modificados en su superficie con grupos p-nitrofenilo mediante reducción electroquímica de una sal de p-nitrofenildiazonio generada *in situ* y sin aislamiento de la misma, seguido de reducción electroquímica de los grupos nitro a grupos amino. Los electrodos modificados con grupos amino se enlazan covalentemente al receptor biológico, en este caso la enzima tirosinasa, a través de glutaraldehído como agente entrecruzante (ver página 188 y Fig. 1).

Las características de las reivindicaciones 1,2,4-11 ya son conocidas a partir de lo que divulgan los documentos D01 y D02. Por lo tanto estas reivindicaciones no se considera nuevas ni con actividad inventiva a la vista del estado de la técnica conocido (artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

El problema técnico que plantea la solicitud radica en la funcionalización de superficies catalíticas de sensores para mejorar la sensibilidad en el análisis de metabolitos. La solución propuesta en la solicitud supone una base funcionalizada con grupos arilamino procedentes de iones arenodiazonio unidos a la plataforma base, y que presenta dopamina unida de forma covalente a la superficie del electrodo a través de un agente de enlace químico entrecruzante al cual se fija el receptor biológico.

El documento D03 divulga la modificación de la superficie de electrodos de carbono con grupos fenilamino y fenilcarboxilo procedentes de iones arenodiazonio sustituídos para derivar en grupos funcionales catecol. La inmovilización del neurotransmisor dopamina sobre la superficie de estos electrodos se lleva a cabo, en el caso de electrodos funcionalizados con grupos fenilcarboxilo, utilizando carbodiimida como agente de acoplamiento.

Resultaría obvio para un experto en la materia, sobre todo cuando se va a obtener el mismo resultado (la modificación superficial de electrodos mediante su acoplamiento con receptores biológicos unidos covalentemente a la superficie de los mismos), emplear superficies catalíticas funcionalizadas con grupos arilamino procedentes de iones arenodiazonio a las que se une dopamina como receptor biológico a través de un agente de enlace multifuncional como lo descrito en la invención, como superficie catalítica alternativa a la descrita en D03. Por otra parte, aunque no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica anterior de manera específica el uso de estas superficies catalíticas funcionalizadas para la detección de contaminantes medioambientales, a la vista de lo descrito en D01 y D02 ésta sería un mera variación estructural de las superficies catalíticas descritas en D01 y, sobre todo, en D02.

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 3 y 12 se considera que no implican actividad inventiva y no satisfacen el criterio establecido en el artículo 8.1 LP 11/1986.