



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 263 350**

② Número de solicitud: 200402382

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/84 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **01.10.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2006**

Fecha de la concesión: **10.10.2007**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

⑦ Titular/es: **Universidad de Oviedo
Plaza del Riego 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑧ Inventor/es: **Costa García, Agustín;
González García, María Begoña y
Hernández Santos, David**

⑨ Agente: **No consta**

⑩ Título: **Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas con electrodos de carbono.**

⑪ Resumen:

Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas con electrodos de carbono. La electrodeposición de plata sobre un electrodo de carbono es catalizada por metales como cobre, paladio y platino depositados en la superficie del electrodo. La determinación electrocatalítica de estos metales o de sus complejos en disolución combina de manera adecuada una preconcentración de los mismos por reducción al estado fundamental sobre un electrodo de carbono, con la catálisis que estos metales ejercen sobre la reducción de la plata en disolución. Estos dos efectos provocados sobre la superficie de un electrodo de carbono hacen que se puedan determinar concentraciones muy bajas de los citados metales en disolución.

ES 2 263 350 B1

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

DESCRIPCIÓN

Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas con electrodos de carbono.

5

Antecedentes de la invención

La electrodeposición de metales sobre la superficie de un electrodo es el método más sencillo y más empleado para provocar procesos electrocatalíticos sobre la superficie de dichos electrodos. Muchos son los ejemplos de procesos electrocatalíticos llevados a cabo empleando electrodos modificados de este modo. En muchas ocasiones, los responsables de las propiedades electrocatalíticas de los electrodos modificados no son los metales en sí, sino derivados de éstos (por ejemplo, óxidos metálicos) que se forman en la superficie electródica.

10

La electrodeposición de un metal se puede conseguir aplicando un potencial adecuado durante un determinado tiempo. Sin embargo, cuando se modifican electrodos con fines electrocatalíticos la metodología empleada en la mayoría de los casos implica, después de un pretratamiento inicial del electrodo, la aplicación de sucesivos ciclos de potencial en un intervalo apropiado para la electrodeposición del metal. Así, siguiendo esta metodología para modificar un electrodo de carbono vitrificado con óxidos de molibdeno, se ha estudiado la reducción electrocatalítica del anión yodato (L. Kosminsky, M. Bertotti, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 471, 37). Del mismo modo electrodos de carbono vitrificado con paladio electrodepositado han sido utilizados como superficies electrocatalíticas para la determinación de ácido oxálico (I.G. Casella, C.G. Zambonin, F. Prete, *J. Chromatogr. A*, 1999, 833, 75) y óxido nitroso (B. Wang, X.L. Li, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 2181) en medio acuoso. Diversos alcoholes (metanol, etanol, isopropanol y butanol) y azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) han sido oxidados electrocatalíticamente gracias a la modificación de la superficie de un electrodo de carbono vitrificado con óxido de níquel (S. Berchmans, H. Gomathi, G. Prabhakara Rao, *J. Electroanal. Chem.*, 1995, 394, 267).

15

20

25

Uno de los metales más utilizados en procesos electrocatalíticos es el platino. Electrodos modificados con este metal han sido utilizados para la oxidación de metanol (A.A. Mikhaylova, O.A. Khazova, V.S. Bagotzky, *J. Electroanal. Chem.*, 2000, 480, 225; Y. Takasu, H. Itaya, T. Iwazaky, R. Miyoshi, T. Ohnuma, W. Sigumoto, Y. Murakami, *Chem. Com.*, 2001, 4, 341; J. Luo, Y.B. Lou, M.M. Maye, C.J. Zhong, M. Hepel, *Electrochem. Com.*, 2001, 3, n° 4, 172) o como detector para la determinación de Br^- , I^- , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y SCN^- mediante cromatografía fónica (A. Liu, L. Xu, T. Li, S. Dong, E. Wang, *J. Chromatogr. A*, 1995, 699, 39).

30

En otras ocasiones la electrodeposición se consigue fijando un determinado potencial y aplicándolo durante un cierto tiempo. De esta manera se modificaron electrodos de carbono vitrificado con paladio y platino, formándose una aleación de Pd-Pt en la superficie del electrodo. Estos electrodos así modificados han sido utilizados para la detección electrocatalítica de formaldehído, acetaldehído y propionaldehído mediante un análisis por inyección en flujo (J. Wang, P.V.A. Pamidi, G. Cepria, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 330, 151).

35

En la presente invención se utiliza plata como elemento sensibilizador para la determinación de metales o complejos de los mismos en disolución o bien como marcas de biomoléculas. En este sentido cabe mencionar el método desarrollado por Costa y colaboradores (D. Hernández Santos, M.B. González García, A. Costa García, *Electrochim. Acta*, 2000, 46, 607; D. Hernández Santos, M.B. González García, A. Costa García, *Electroanalysis*, 2000, 12, n° 18, 1461) en el que electrodos de pasta de carbono son modificados, o bien con oro coloidal por adsorción, o con oro en disolución que ha sido reducido en la superficie del electrodo. Este oro metálico cataliza la reducción de plata en el electrodo. Una diferencia importante con respecto a la mayoría de los casos de electrocatalisis es que, en este caso, dicha electrocatalisis se utiliza para determinar la concentración del modificador (oro metálico) y no de la especie que sufre el proceso catalítico (plata). Este procedimiento ha sido aplicado al seguimiento de la reacción estreptavidina-biotina, empleando oro coloidal como marca (M.B. González García, A. Costa García, *Biosensors & Bioelect.*, 2000, 15, n° 11-12, 663).

40

45

50

En la patente de Costa y colaboradores ES2102970 se reivindican electroensayos de determinación de oro en disolución y de oro en partículas independientemente de que sean o no marcas utilizadas en electroinmunoensayos de reconocimiento biológico.

55

Descripción de la invención

La presente invención es de aplicación a la cuantificación de metales en disolución utilizando plata como elemento sensibilizador. Se basa en que la presencia de estos metales en el electrodo hace que el potencial de reducción de la plata (en una disolución amoniacal) se desplace hacia potenciales menos positivos. Esto hace que se disponga de un intervalo de potenciales en los cuales sólo se electrodepositará plata en el electrodo si existe metal en la superficie del mismo. La redisolución de esta plata electrodepositada a un potencial comprendido dentro de este intervalo, da lugar a un proceso anódico cuya intensidad de pico está directamente relacionada con la cantidad de metal presente en la superficie del electrodo.

65

Estos metales pueden estar en disolución o actuando como agente de marcaje de reactivos inmunológicos, hebras de ADN o cualquier otro reactivo que intervenga en ensayos de afinidad. Generalmente se encuentran en forma iónica o formando distintos complejos y para poder determinarlos voltamperométricamente con un electrodo de

ES 2 263 350 B1

carbono es necesario depositarlo previamente en su superficie aplicando un potencial adecuado durante un tiempo determinado.

5 Los electrodos de carbono que se pueden utilizar son electrodos de pasta de carbono, de carbono vitrificado, electrodos serigrafiados de carbono (screenprinted de carbono) o ultramicroelectrodos.

10 Para que los ensayos sean reproducibles es conveniente tratar la superficie electródica. Para ello se prepara electroquímicamente la superficie del electrodo de carbono aplicando un potencial oxidante fijo (superior a +1.25 V) o intensidad constante muy positiva durante un tiempo determinado en una disolución de ácido sulfúrico.

15 La deposición del metal o complejo metálico en la superficie del electrodo puede realizarse siguiendo metodologías conocidas consistentes generalmente en introducir el electrodo en la muestra en la que se quiere determinar el metal en disolución y aplicar los potenciales convenientes para que ese metal o complejo metálico en disolución se concentre sobre el electrodo en forma de metal en su estado elemental. El potencial aplicado depende del metal y del complejo metálico.

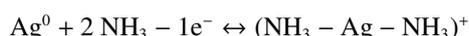
20 En algunos casos para que la catálisis sea efectiva y reproducible es necesario llevar a cabo una etapa de oxidación después de la deposición del metal. Esta etapa se lleva a cabo sometiendo al electrodo a un potencial oxidante superior a +1.30 V o bien a una intensidad constante positiva en una disolución de ácido sulfúrico. Esta etapa da lugar a la formación de óxidos de metal que son responsables de la catálisis de plata. Además, evita que la plata se deposite directamente en el electrodo cuando la deposición del metal en el electrodo exige potenciales muy reductores donde se genera una atmósfera reductora que cataliza la deposición posterior del elemento sensibilizador en el electrodo. Si bien, esta etapa en algunos casos se puede suprimir. Un ejemplo de ello será descrito más adelante.

25 El recubrimiento del metal por plata metálica se lleva a cabo una vez depositado el metal sobre el electrodo introduciendo éste en una disolución amoniacal de plata (I), con una concentración de plata de $2 \cdot 10^{-4}$ M.

30 Las partículas de metal depositadas previamente favorecen la reducción de la plata en disolución normalmente en la forma $(\text{NH}_3\text{-Ag-NH}_3)^+$ a plata elemental (Ag^0) debido a que el metal en estado elemental u oxidado cataliza la reducción de plata al desplazar los potenciales de deposición de la misma hacia potenciales más positivos. Se provoca así una electrodeposición de la plata a potenciales en los que la plata no se reduce si no existen partículas del metal en el electrodo.

35 El potencial de reducción electrocatalítica de la plata depende del metal depositado en el electrodo. La cantidad de plata depositada sobre el electrodo está relacionada con la cantidad de metal o complejo metálico previamente depositado.

40 Una vez realizada la electrodeposición catalítica de la plata, en el mismo medio amoniacal se somete al electrodo de carbono a un barrido de potenciales desde el potencial seleccionado para la electrocatalisis hacia potenciales positivos para provocar el proceso de redisolución anódica de la plata según:



45 Dando lugar a un pico de redisolución anódica cuya intensidad está relacionada con la concentración de plata acumulada como consecuencia de la electrocatalisis provocada por el metal previamente depositado.

Ejemplo de realización de la invención

50 La eficacia del procedimiento se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo 1

55 Muestra la catálisis que metales como cobre, paladio y platino y un complejo del mismo (cisplatino) convenientemente depositados sobre electrodos de pasta de carbono muestran sobre la electrodeposición de plata. La metodología consta de las siguientes etapas:

60 - Adecuación de la superficie electródica. Para ello se activa el electrodo aplicando un potencial de +1.50 V (vs. electrodo de referencia Ag/AgCl) durante 2 minutos en una disolución 0.1 M de H_2SO_4 . En el caso del cisplatino (complejo de platino (II)) se aplica una intensidad de corriente constante de +13 μA durante 2 minutos en el mismo medio.

65 - Deposición del metal o complejo metálico en la superficie del electrodo. Esta etapa se realiza sumergiendo el electrodo en una disolución del metal o complejo del mismo y se aplica un potencial constante durante 5 minutos. Los potenciales aplicados son -0.40 V para el platino, cisplatino y paladio, y -0.20 V para el cobre. Aplicando estos potenciales se logra depositar los metales en la superficie del electrodo en su estado elemental. Para cada metal se utiliza un electrodo distinto.

ES 2 263 350 B1

- Etapa de oxidación. Se lleva a cabo sometiendo al electrodo a un potencial oxidante superior a +1.40 V durante 1 minuto en una disolución 0.1 M de H₂SO₄. En el caso del cisplatino es suficiente aplicar una intensidad constante de +0.5 μA durante 1 minuto en el mismo medio.

5 - Etapa de recubrimiento del metal por plata metálica. Una vez depositado el metal sobre el electrodo, se introduce éste en una disolución amoniacal (1.0 M NH₃) de plata, con una concentración de plata $2 \cdot 10^{-4}$ M y se aplica un potencial de -0.18 V durante 1 minuto. A este potencial se produce una electrodeposición de la plata que de no haber metal depositado en el electrodo no tendría lugar.

10 - Redisolución de la plata metálica. Una vez realizada la electrodeposición catalítica de la plata, en el mismo medio amoniacal se somete al electrodo de carbono a un barrido de potenciales anódico desde el potencial seleccionado hasta +0.30 V con una velocidad de barrido de potenciales de 50 mV/s registrándose el voltamperograma cíclico correspondiente al proceso de redisolución anódica de la plata según:



Dando lugar a un pico de redisolución anódica a +0.10 V cuya intensidad está relacionada con la concentración de plata acumulada como consecuencia de la electrocatalisis provocada por el metal previamente depositado.

20 Utilizando esta metodología se ha observado que cobre, paladio y platino fijados sobre un electrodo de pasta de carbono catalizan la reducción de plata (Ag⁺) al estado elemental (Ag⁰) cuando se aplica un potencial adecuado a ese electrodo en un medio amoniacal y no necesita reductor químico ninguno. El poder catalítico de estos metales es distinto, obteniéndose un mayor desplazamiento del potencial de reducción de la plata cuando el catalizador es paladio o platino. Este último metal contenido en complejos de cis-platino puede ser también detectado usando la metodología descrita anteriormente.

25 El pretratamiento electrodo da lugar a una reproducibilidad interelectrónica aceptable siendo la desviación estándar relativa de la señal analítica del 7% para concentraciones de los metales de 1×10^{-7} M.

30 Aprovechando la electrodeposición catalítica de plata que estos metales muestran se pueden detectar concentraciones muy bajas de los mismos en disolución (del orden de 10^{-9} M e inferiores). Además cobre, paladio y platino o complejos de los mismos pueden ser utilizados como marcas de biomoléculas que son fácilmente detectadas una vez fijadas éstas sobre el electrodo.

35 La plata puede ser utilizada como elemento sensibilizador para la determinación de aquellos metales que una vez depositados sobre la superficie del electrodo den lugar a un desplazamiento del potencial del proceso de reducción de la plata.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas con electrodos de pasta de carbono para la cuantificación de paladio, cobre, y platino en disolución.

2. Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas, según la reivindicación anterior, **caracterizadas** porque utilizan cobre, paladio o platino o un complejo de los mismos como marcas para la cuantificación de otras moléculas.

10 3. Plata como elemento sensibilizador en determinaciones electrocatalíticas no enzimáticas, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas** porque utilizan electrodos de carbono vitrificado, electrodos serigrafiados de carbono o ultramicroelectrodos distintos al electrodo de pasta de carbono para obtener la señal analítica.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 263 350

② Nº de solicitud: 200402382

③ Fecha de presentación de la solicitud: 01.10.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/84** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HERNANDEZ-SANTOS, D. et al. "Electrochemical determination of gold nanoparticles colloidal solutions"ELECTROCHIMICA ACTA. 2000. Vol. 46. Páginas 607-615, todo el documento.	
A	KIOWINO, I.O. et al. "Novel Electrochemical Detection Scheme for DNA Binding Interactions Using Monodispersed Reactivity of Silver Ions"LANGMUIR. 2003. Vol. 19. Páginas 4344-4350, todo el documento.	
A	CAI, H. et al. "Cu@Au alloy nanoparticle as oligonucleotides labels for electrochemical stripping detection of DNA hybridization"BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS. 2003. Vol. 18. Páginas 1311-1319, todo el documento.	
A	WANG, J. et al. "Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization"LANGMUIR. 2001. Vol. 17. Páginas 5739-5741, todo el documento.	

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

12.06.2006

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/1