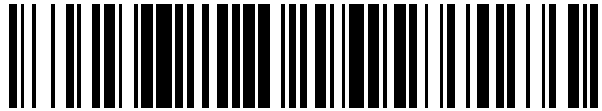


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 356 220**

21 Número de solicitud: 200930727

51 Int. Cl.:

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

C03C 3/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **23.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2011**

Fecha de la concesión: **03.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **15.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.02.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE
CARRETERA DE SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG, ALICANTE, ES
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

72 Inventor/es:

**SALINAS CASTILLO, ALFONSO y
MONTILLA JIMÉNEZ, FRANCISCO**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE ELECTRODOS BIOMIMÉTICOS Y SUS USOS COMO
SENSORES AMPEROMÉTRICOS.**

57 Resumen:

Procedimiento de fabricación de electrodos biomiméticos y sus usos como sensores amperométricos.

Procedimiento de fabricación de electrodos biomiméticos basado en un método de depósito electroasistido de capas de sílice impresas molecularmente sobre electrodos. Además la invención se refiere a estos electrodos biomiméticos y a su uso para la fabricación de sensores amperométricos, voltamperométricos, impedimétricos o potenciométricos para la detección altamente selectiva de sustancias de interés ambiental, bioquímico o alimentario.

ES 2 356 220 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de electrodos biomiméticos y sus usos como sensores amperométricos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de electrodos biomiméticos basado en un método de depósito electroasistido de capas de sílice impresas molecularmente sobre diversos electrodos. Estos electrodos biomiméticos se utilizan para la detección altamente selectiva de sustancias de interés ambiental, bioquímico y alimentario.

10

Estado de la técnica anterior

15 Con el fin de buscar soluciones a los inconvenientes que presentan los materiales sensores “clásicos” (largos tiempos de respuesta, baja sensibilidad y selectividad, así como poca estabilidad) se están siguiendo diversas líneas de investigación. Una de las más prometedoras y novedosas tecnologías utilizadas es la preparación de polímeros de impronta molecular (MIPs, “molecularly imprinted polymers”) (cfr. F.L. Dickert y col., *Trends in Anal. Chem.*, 1999, 18, 192).

20 Los polímeros de impronta molecular son matrices sintetizadas artificialmente que presentan, en teoría, la capacidad de reconocer e interaccionar de forma específica con determinados compuestos. Es decir, se trata de materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo).

25 En general, la síntesis de MIPs se lleva a cabo mediante la formación de un polímero entrecruzado por copolimerización inicial de una serie de monómeros funcionales y entrecruzadores en presencia de la molécula molde (que generalmente será el analito de interés o una análoga) en un disolvente adecuado. La posterior liberación de la molécula molde permite la obtención de un material nanoestructurado, con “memoria” selectiva para el molde, y que simula el reconocimiento molecular típico en sistemas biológicos. Variando las condiciones de polimerización, como son la temperatura, el grado de entrecruzamiento de los monómeros, y la molécula molde, estos polímeros pueden ser
30 obtenidos con características altamente selectivas. Poseen buena estabilidad química a largo plazo, resistencia mecánica y química elevada, y la posibilidad de diseñar receptores específicos para un elevado número de sustratos, lo que justifica el enorme potencial que presentan los MIPs en el desarrollo de nuevas fases sensoras.

35 Aunque hay diversas vías para la preparación de los MIPs, son dos las más utilizadas: covalente y no-covalente.

40 La vía covalente se basa en la co-polimerización inicial de monómeros funcionales con un derivado polimerizable de la molécula molde. Esto supone derivatizar previamente dicha molécula. Por adición de un monómero entrecruzador y en presencia de un agente iniciador de la polimerización, se fija la estructura del aducto en una red tridimensional. La posterior liberación de la molécula molde se lleva a cabo por métodos químicos, generalmente hidrólisis que rompe los enlaces covalentes creados.

45 Las ventajas más importantes de esta vía son la creación de sitios de unión muy específicos y la no influencia del disolvente empleado en la síntesis. Por el contrario, tienen el inconveniente de ser lentos, no reversibles para el proceso de reconocimiento, por lo que dichos polímeros no resultan adecuados para su utilización en sistemas donde se requiera una respuesta rápida y además, las capacidad de reocupación de éstos oscila entre 10-15%; este hecho es atribuido a que los sitios de unión se encuentran fundamentalmente en zonas internas del mismo.

50 En la vía no-covalente, la molécula molde interacciona con los monómeros funcionales formando un agregado en el que predominan interacciones de tipo enlace de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlaces de Van der Waals, etc. Los monómeros funcionales y de entrecruzamiento suelen ser de la misma naturaleza que los utilizados en la vía covalente. El proceso comienza con un ordenamiento de los monómeros funcionales alrededor de la molécula molde, en un disolvente adecuado, para producir un sistema pre-organizado cuya estructura se fija durante el entrecruzamiento, análogo al caso anterior. La extracción de la molécula no requiere ahora roturas de enlaces covalentes y puede llevarse
55 a cabo por un proceso de extracción suave con un disolvente de características adecuadas.

60 Los inconvenientes de este tipo de polímeros son que se crean huecos menos específicos y que el disolvente compite con los monómeros funcionales en la interacción con la molécula molde. Sin embargo, la capacidad de reocupación de éstos oscila 80-90%; en este caso los puntos de unión se encuentran en zonas más accesibles.

65 Se encuentran en la literatura científica numerosas referencias a la modificación de electrodos con capas de polímeros de impronta molecular para su aplicación a la detección biomimética de diversos analitos (cfr. US6057377). En concreto, la modificación de electrodos con capas de polímero de impronta molecular como el polifenol (cfr. E. Granot y col. *Advanced Functional Materials*, 2008, 18, 478-484) capas acrílicas (cfr. M. C. Blanco-López y col., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1922-1928) o la poli-o-fenilenediamina (cfr. R. Z. Ouyang y col., *Advanced Functional Materials*, 2007, 17, 3223-3230) encuentran aplicación en la detección selectiva de diversas sustancias de interés biológico, como monosacáridos y neurotransmisores.

Especial interés tienen los electrodos modificados con sílice o sílices orgánicas que pueden ser impresos molecularmente. Las capas de sol-gel de sílice impresa suelen ser depositadas sobre el electrodo transductor mediante técnicas habituales (depósito por giro spin-coating, o por inmersión dip-coating), partiendo de disoluciones precursoras (sol) que contienen la molécula molde y se dejan gelificar en su presencia.

5 El molde generalmente se extrae del interior de la capa mediante lavado con disolventes. Estas capas se han aplicado a la detección electroquímica de diversas especies (cfr. R. Gupta y A. Kumar, *Biotechnology Advances*, 2008, 26, 533-547). Detección selectiva de neurotransmisores: epinefrina o dopamina (cfr. C. W. Hsu y M. C. Yang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 134, 680-686; P. C. Pandey y B. C. Upadhyay, *Talanta*, 2005, 67, 997-1006; N. Gao y col., *Electroanalysis*, 2007, 19, 1655-1660), detección de aminoácidos (cfr. Z. Zhang y col., *Analytical Biochemistry*, 2005, 336, 108-116), detección de proteínas (cfr. Z. Zhang y col., *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 1244-1251), detección enantioselectiva y reconocimiento quiral (S. Marx y D. Avnir, *Accounts of Chemical Research*, 2007, 40, 768-776; S. Fireman-Shoresh y col., *Langmuir*, 2005, 21, 7842-7847).

15 El proceso de depósito y extracción del molde es clave para la obtención de una fase sensora altamente selectiva ya que la formación de agujeros o grietas producidos durante el procesado de la capa empeora sensiblemente la selectividad de la fase sensora.

20 En muchas ocasiones, el depósito de las capas de polímero se realiza por técnicas electroquímicas (electropolimerización). Este tipo de depósito permite obtener capas finas con un elevado control en su morfología y propiedades. Habitualmente, para realizar el depósito electroquímico de un polímero, se introduce un electrodo en una disolución precursora (de un monómero o mezcla de varios) y se aplica un potencial de oxidación. Los monómeros oxidados (en forma de radical-catión) se acoplan entre sí dando lugar a un polímero que se va depositando en la superficie del electrodo (reacción radicalaria). Polímeros conductores típicos preparados de esta forma son la polianilina, el polipirrol, el politiofeno, etc.

25 En un principio, los polímeros electroquímicamente generados de esta forma podrían ser considerados de gran interés para formar capas impresas molecularmente, sin más que introducir la molécula molde de interés en la disolución precursora, junto a los monómeros. Sin embargo, el hecho de que sea necesario aplicar un potencial elevado para oxidar el monómero (p. ej. +1.1 V/ENH, para la anilina) limita las moléculas molde utilizables ya que éstas deben tener un potencial de oxidación mayor que el propio monómero. Si esto no es así, la molécula molde se degradaría a los potenciales en los que se obtiene el polímero deseado.

35 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de electrodos biomiméticos basado en un método de depósito electroasistido de capas de sílice impresas molecularmente sobre diversos electrodos. Estos electrodos biomiméticos se utilizan para la detección altamente selectiva de sustancias de interés ambiental, bioquímico y alimentario.

40 En los ejemplos se demuestra cómo el depósito electroasistido de sílice en presencia de una molécula molde en la disolución precursora da lugar a la formación de una capa que actúa como filtro con elevada selectividad para la detección de la molécula de interés.

45 Las capas de sol-gel impresas depositadas sobre electrodos aumentan la selectividad frente al analito de interés. El depósito electroasistido por reducción electroquímica se realiza en presencia de una molécula molde (que generalmente será el analito de interés o un análogo estructural). Se pueden optimizar fácilmente las propiedades de la capa mediante los potenciales de reducción, los tiempos empleados en el depósito, concentración de molécula molde, entre otros parámetros.

50 Una vez realizado el depósito se procede a la eliminación de la molécula molde, por ejemplo por degradación electroquímica o por lavado con disolventes. Al eliminar la molécula molde los poros de sílice quedan impresos a nivel molecular, lo que produce un material de carácter biomimético con una elevada especificidad y afinidad por la molécula de interés. Posteriormente, el analito será detectado amperométricamente sobre la superficie del electrodo tras atravesar los poros de material. Las ventajas del procedimiento de la invención vienen dadas por el elevado control en el depósito de la sílice cuando se realiza de forma electroasistida, permitiendo modular el espesor de dicha capa de sílice y la morfología de la misma, con lo que produce una capa altamente coherente y reproducible.

60 Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un electrodo biomimético (en adelante procedimiento de la invención) que comprende:

- a) mezclar una disolución precursora de sílice con una disolución acuosa que contiene un electrolito soporte, la disolución final puede estar a un pH ácido o básico,
- 65 b) agitar la mezcla de la etapa (a) para producir la hidrólisis de los precursores
- c) añadir a la mezcla obtenida en la etapa (b) una molécula molde,

- d) introducir un electrodo en la mezcla de la etapa (c) y aplicar a dicho electrodo un potencial eléctrico o una corriente eléctrica de reducción u oxidación, y
- e) eliminar la molécula molde del electrodo modificado obtenido en la etapa (d).

5

En la presente invención, por “electrodos biomiméticos” se entiende a aquellos electrodos modificados con matrices sintetizadas y que han sido diseñados de tal forma que tienen la capacidad de reconocer e interactuar de forma específica con determinados compuestos. Estos electrodos reproducen de manera básica el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc.).

10

Para la fabricación del electrodo biomimético se prepara una disolución precursora de la sílice, esta disolución puede contener al menos un alcóxido de silicio o una mezcla de alcóxidos de silicio y, si fuera necesario la disolución precursora además contiene un alcohol.

15

En una realización preferida del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el alcóxido de silicio se selecciona entre tetraetilortosilano (TEOS), tetrametoxisilano (TMOS) o combinación de los mismos. Más preferiblemente, el alcóxido de silicio es tetraetilortosilano.

20

En otra realización preferida de dicho procedimiento, en la etapa (a) el alcohol que se selecciona entre etanol, metanol, *iso*-propanol, *n*-propanol, butanol o alcohol bencílico. Más preferiblemente, el alcohol es etanol.

25

A dicha disolución precursora de sílice se le adiciona una disolución acuosa con un electrolito soporte. Este electrolito soporte se utiliza para que proporcione conductividad a la disolución final y puede ser una sal inerte.

30

En otra realización preferida del procedimiento, dicho electrolito soporte es una sal que se selecciona de la lista que comprende KCl, NaCl, Na₂SO₄, NaNO₃ o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, la sal es KCl. Dicho electrolito puede estar a una concentración de entre 0.001 y 3 M, más preferiblemente a una concentración de entre 0.1 y 1.0 M, más preferiblemente a una concentración de 0.5 M.

35

Esta disolución precursora junto con la disolución del electrolito soporte de la etapa (a) se acondiciona a un pH adecuado, para dar lugar a la hidrólisis de los precursores de la sílice. Para que se produzca la hidrólisis de los precursores esta etapa debe estar catalizada por protones (es decir, a pH ácido) o bien por -OH (es decir, a un pH básico), sin embargo a pH neutro la hidrólisis se produce muy lentamente o no se produce. Esta etapa de hidrólisis del procedimiento de la invención se produce mediante agitación (paso (b) del procedimiento de la invención). Una posterior reacción de condensación catalizada a un pH diferente al de la hidrólisis daría lugar a la gelificación de la matriz de sílice, como se describe a continuación en el paso (d) del procedimiento de la invención.

40

En otra realización preferida, en la etapa (a) la mezcla resultante se lleva a un valor de pH comprendido entre 0 y 7, para la hidrólisis del precursor en la etapa (b), empleando un ácido que se selecciona entre HCl, H₂S, H₂SO₄, CH₃COOH, HCOOH, HOOC-COOH HClO₄, HNO₃ con una concentración entre 0.0001 y 2 M. Más preferiblemente, el ácido es HCl, con una concentración de 0.1 M.

45

Adicionalmente, en esta etapa (a) del procedimiento de la invención se puede añadir algún compuesto organoalcoxilano para modificar las propiedades del material obtenido. Preferiblemente, un organoalcoxilano que se selecciona de la lista que comprende metiltrietoxisilano, metiltrimetoxisilano, feniltrietoxisilano, viniltrietoxisilano o cualquiera de sus combinaciones.

50

Tras la etapa de hidrólisis, esta disolución precursora se introduce en una célula electroquímica y se le añade una cantidad de la molécula molde de interés con la que se quiere imprimir la matriz de sílice, para poder ser detectada posteriormente. En la célula electroquímica se sumerge un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar.

55

En una realización preferida del procedimiento de la invención, en la etapa (c) la molécula molde puede ser una hormona, un enzima, una proteína, un antígeno, un azúcar, en general cualquier molécula orgánica o metabolito biológicamente activo susceptibles de ser analizados, como por ejemplo pero sin limitara a dopamina, epinefrina, ácido úrico, glucosa colesterol o resveratrol, preferiblemente con una concentración entre 0.001 y 3 M. Más preferiblemente, la molécula molde es dopamina o glucosa, más preferiblemente aún la concentración de la molécula molde está en una concentración de entre 0.05 y 1.5 M, más preferiblemente a 0.1 M.

60

El electrodo sobre el que se realiza el depósito actúa como electrodo de trabajo. Como electrodos de trabajo se pueden utilizar gran variedad de materiales, como por ejemplo pero sin limitarse a materiales carbonosos como carbono vítreo, grafito, diamante dopado con boro, electrodos modificados con nanotubos de carbono o electrodos metálicos como oro, plata, platino, acero, cobre, níquel, entre otros. Alternativamente, se puede utilizar electrodos serigrafados, habitualmente de carbono, oro o platino, soportado en base cerámica o plástica. Más preferiblemente, el electrodo es carbono vítreo u oro.

65

Una vez adicionada la molécula molde y el electrodo de trabajo, se aplica un potencial eléctrico o una corriente eléctrica de reducción u oxidación sobre el electrodo de trabajo con el fin de que se produzca una reacción electroquímica

como, por ejemplo, reducción u oxidación electroquímica de agua, reducción electroquímica de oxígeno disuelto, reducción de nitratos, entre otras reacciones conocidas por cualquier experto en la materia. Esto produce un cambio del pH local en el entorno del electrodo, produciéndose la deposición de matriz de sílice que contiene la molécula molde.

5 En una realización preferida de dicho procedimiento, en la etapa (d) para realizar el depósito electroasistido cuando se realiza de forma potenciostática se aplica un potencial eléctrico con un valor de entre +0.5 y -3.0 V frente a un electrodo normal de hidrógeno y más preferiblemente durante un tiempo de entre 5 s y 30 min.

10 Y en otra realización preferida del procedimiento, en la etapa (d) cuando se realiza el depósito galvanostático se aplica una densidad de corriente eléctrica con un valor de entre 0 y -100 mA cm⁻² y más preferiblemente durante un tiempo de entre 5 s y 30 min.

15 En la presente invención, el “depósito electroasistido” se refiere a un proceso electroquímico en el que se usa una corriente eléctrica para reducir u oxidar especies disueltas en una solución acuosa que los contiene que no son las especies que se depositan, pero que propician la precipitación de otras moléculas o coloides presentes en la disolución sobre un objeto conductor que será el cátodo o ánodo de la celda, creando un fino recubrimiento alrededor de éste con el material depositado por el cambio de pH.

20 Este cambio de pH produce una aceleración de los procesos de gelificación por la rápida agregación de los coloides de sílice en la disolución precursora en el entorno del electrodo de trabajo. Estos coloides agregados se generan en la disolución que contiene la molécula molde atrapándola en su interior (Figura 1). Los coloides así formados se depositan sobre la superficie del electrodo. Al depositarse, la molécula molde queda atrapada en el interior de los poros la matriz de sílice.

25 Una vez depositada la capa de sílice se procede a eliminar la molécula molde. Para ello se puede introducir el electrodo modificado en un disolvente donde sea soluble la molécula molde o, alternativamente, se introduce el electrodo modificado en una célula electroquímica con una disolución acuosa con un electrolito soporte en ausencia de la molécula molde, y se procede a la degradación electroquímica de la molécula contenida en la capa (Figura 1). Este procedimiento libera los poros permitiendo la entrada posterior de nuevas moléculas objeto del análisis.

30 Por tanto, en una realización preferida del procedimiento de la invención, en la etapa (e) la eliminación de la molécula molde se realiza mediante extracción con un disolvente que se selecciona entre aquellos en los que sea soluble la molécula molde.

35 En otra realización preferida de dicho procedimiento, en la etapa (e) la eliminación de la molécula molde se realiza mediante extracción electroquímica utilizando una disolución acuosa con un electrolito que se puede seleccionar entre KCl, NaCl, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de fosfato, etc., más preferiblemente con una concentración entre 0.001 y 3 M, y aplicando un potencial eléctrico en el que se produzca la reacción de degradación electroquímica de la molécula molde. Más preferiblemente, el electrolito es KCl, con una concentración de 0.1 M, y se aplica un potencial eléctrico ciclando entre +0.2 y +1.0 V.

40 El hecho de forzar el paso de las moléculas presentes en la disolución a través de los poros específicos generados asegura la elevada selectividad del sensor electroquímico. La capa formada permite el paso sólo de la molécula molde empleada, impidiendo en gran medida el acceso de otras moléculas potencialmente interferentes hasta la superficie del electrodo (Figura 1.b).

45 La mayor ventaja que presenta el método de depósito electroasistido para preparar fases sensoras sobre electrodos respecto de otros métodos convencionales (como spin-coating o dip-coating) está fundamentalmente relacionada con el control de la coherencia y porosidad de las capas.

50 El principal problema que puede tener una capa sensora preparada mediante impresión molecular y depositada sobre un electrodo por las técnicas habituales es la presencia de agujeros (pinholes) que permitan el paso indiscriminado de especies desde la disolución hasta la superficie del electrodo, lo que interfiere en la detección del analito de interés.

55 El depósito electroasistido propuesto en la presente invención previene la formación de estos poros no controlados. Cuando se polariza el electrodo para realizar el depósito del material se generan líneas de corriente en la dirección normal a la superficie del electrodo (Figura 2.a). La velocidad de la reacción electroquímica, y por tanto del depósito electroasistido, es proporcional a la densidad de estas líneas de corriente.

60 La capa de sílice depositada es de carácter no conductor, lo que hace que en las zonas donde se deposita la sílice se inhiba parcialmente la reacción electroquímica. Las líneas de corriente se concentrarían, por tanto, en otras zonas desprovistas de depósito que son más conductoras (Figura 2.b), donde se produciría un aumento en la velocidad del depósito de sílice.

65 En el caso límite en que casi todo el electrodo estuviera recubierto de una capa de sílice excepto un pequeño agujero (Figura 2.c), todas las líneas de corriente se concentrarían en esa pequeña zona acelerando el depósito de sílice en ese punto. Por tanto, la propiedad fundamental en este proceso de depósito electroasistido de una capa no conductora es su capacidad de autocurarse, evitando la formación de agujeros, obteniéndose así una capa de elevada coherencia.

Por tanto, en un segundo aspecto la presente invención se refiere a un electrodo biomimético obtenible por el procedimiento de la invención (en adelante electrodo biomimético de la invención), que comprende:

- a) un electrodo y
- b) un recubrimiento que comprende una capa de sílice impresa molecularmente.

Los electrodos así fabricados se utilizan para la detección electroquímica en muestras que contienen una concentración desconocida de la molécula de interés que se ha utilizado como molde. La capa de sílice impresa muestra gran afinidad por el analito de interés e impide el acceso de moléculas interferentes hacia la superficie del electrodo.

Por tanto, en un tercer aspecto la presente invención se refiere al uso del electrodo biomimético de la invención para la fabricación de un sensor amperométrico, voltamperométrico, impedimétrico o potenciométrico. Preferiblemente, el sensor es amperométrico.

Además, en un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un sensor (en adelante sensor de la invención) que comprende el electrodo biomimético de la invención.

Y en un último aspecto, la presente invención se refiere al uso del sensor de la invención para la detección electroquímica de la concentración de la molécula molde en una muestra. Preferiblemente, la detección electroquímica es amperométrica, voltamperométrica, impedimétrica o potenciométrica. Y más preferiblemente, la detección electroquímica es amperométrica.

Tras el uso continuado del sensor, es posible que comience a perder efectividad por el colapso de los poros con la especie a determinar. El procedimiento de regeneración es muy sencillo y se basa en repetir el tratamiento de extracción de la molécula molde que se realizó tras la gelificación de la capa, bien limpieza con disolventes, o bien extracción electroquímica. De esta forma, los poros de la fase sensora se liberan para su posterior uso.

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

Descripción de las figuras

Fig. 1: a) muestra un esquema ilustrativo de una capa de sílice impresa depositada sobre un electrodo con la molécula molde atrapada en su interior. Tras el tratamiento de limpieza se consigue liberar los poros para que el analito pueda acceder a través de ellos hasta la superficie del electrodo; b) muestra cómo una vez liberados los poros del material éste permite el paso de la molécula de interés evitando el acceso de interferentes hasta la superficie electródica.

Fig. 2: muestra esquemáticamente las líneas de corriente generadas durante una reacción electroquímica y cómo el depósito electroasistido de la sílice modifica la distribución de estas líneas de corriente, promoviendo la formación de un depósito de sílice muy coherente y homogéneo.

Fig. 3: muestra una micrografía obtenida en un microscopio electrónico de barrido donde se observa el depósito de sílice obtenido sobre un electrodo de carbono vítreo por reducción a -2.2 V/RHE en presencia de una molécula molde (dopamina).

Fig. 4: muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en una disolución acuosa tamponada a pH 7 de ácido ascórbico (AA) 0.5 mM y dopamina (DA) 0.5 mM (relación de concentraciones AA:DA 1:1) a 100 mV s⁻¹. Cada curva corresponde a la respuesta de un electrodo diferente: a) Electrodo de Carbono vítreo; b) Electrodo modificado con una capa de sílice (NIP, potencial de depósito -2.5 V); c) Electrodo modificado con una capa de sílice impresa molecularmente con dopamina (MIP, potencial de depósito -2.5 V).

Fig. 5: muestra un diagrama de barras que cuantifica la selectividad de los distintos electrodos utilizados (GC, NIP y MIP) preparados a distintas condiciones de potencial de depósito, en el caso de los electrodos modificados con sílice. Tiempo de depósito 1 min.

Fig. 6: muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en una disolución acuosa tamponada a pH 7 de ácido ascórbico 6 mM y dopamina 0.5 mM (relación 12:1) a 100 mV s⁻¹. Cada curva corresponde a la respuesta de un electrodo diferente: GC Electrodo de Carbono vítreo; NIP Electrodo modificado con una capa de sílice; MIP Electrodo modificado con una capa de sílice impresa molecularmente con dopamina.

Fig. 7: muestra la respuesta amperométrica a +0.9 V de un electrodo modificado con sílice impresa con dopamina (electrodo MIP), al realizar adiciones sucesivas de dopamina en presencia de interferente, ácido ascórbico 0.05 M.

Fig. 8: muestra la respuesta amperométrica estabilizada a +0.9 V de un electrodo modificado con sílice impresa con dopamina (electrodo MIP) frente a la concentración de dopamina en presencia de interferente, ácido ascórbico 0.05 M (relación de concentraciones en torno a 200000:1).

Fig. 9: muestra la respuesta voltamétrica de un electrodo modificado con sílice impresa que ha sido utilizado en la detección de dopamina en una disolución KCl 0.1 M. Al realizar sucesivos barridos voltamétricos se observa la oxidación-degradación de la dopamina atrapada en los poros del material. Tras 10 ciclos voltamétricos los poros quedan liberados pudiendo reutilizarse el electrodo para la detección de dopamina.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los electrodos biomiméticos con aplicaciones en el desarrollo de sensores amperométricos altamente selectivos.

Ejemplo 1

Determinación de dopamina

Detección amperométrica de dopamina en presencia de interferente (ácido ascórbico).

La dopamina pertenece a la familia de las catecolaminas y tiene una función como neurotransmisor. Es además un intermedio metabólico de la conversión de la adrenalina en tirosina. Los niveles normales en sangre de dopamina se encuentran entre 0.01-1 mM. La presencia de niveles anormales se ha relacionado con procesos neurodegenerativos, como la enfermedad del Parkinson.

La detección electroquímica de esta sustancia suele estar interferida por la presencia del ácido ascórbico en los fluidos fisiológicos. El ácido ascórbico se oxida a potenciales parecidos a la dopamina pero la principal causa de interferencia es que está en concentraciones mucho mayores (relaciones de concentración de 100000:1).

Es por tanto necesario para tener una correcta determinación de dopamina en fluidos obtener fases sensoras de elevada selectividad. Se muestra a continuación en detalle el método de síntesis de un electrodo para la detección selectiva de dopamina.

Se prepara una disolución precursora de las capas de sílice con la siguiente composición: Se mezclan 6 ml de TEOS con 8.2 ml de etanol. A esta mezcla se le añaden 5.8 ml de una disolución acuosa de KCl 0.5 M + HCl 0.1 M. Esta disolución se agita bajo campo de ultrasonidos durante 15 minutos en un envase cerrado para que se produzca la hidrólisis del TEOS.

La disolución precursora hidrolizada se introduce en una célula electroquímica y se añade la molécula molde, dopamina en este caso, hasta alcanzar una concentración 0.1 M. Como electrodo de referencia se emplea un electrodo reversible de hidrógeno (RHE) y el electrodo auxiliar o contraelectrodo es una espira de platino. El electrodo de trabajo sobre el que se realiza el depósito es un electrodo de carbono vítreo pulido que se introduce en la disolución.

Se aplica sobre este electrodo un potencial de reducción para que se dé la reacción de reducción del disolvente (generación de hidrógeno). Se realizó la optimización de la sílice impresa realizando depósitos de la misma a potenciales comprendidos entre -2.0 y -2.5 V, realizando depósitos de sílice durante distintos tiempos comprendidos entre 30 s y 2 min.

Tras formarse el depósito, el electrodo se extrae de la célula de gelificación para proceder a la extracción de la molécula molde. Para ello, se introduce el electrodo en otra célula electroquímica de limpieza que contiene una disolución acuosa 0.1 M KCl y se procede a oxidar voltaméricamente la dopamina contenida en los poros del material, ciclando entre +0.2 y +1.0 V. Tras 5 ciclos voltamétricos, la carga neta de oxidación es nula, lo que indica que toda la dopamina incluida en la capa ha sido efectivamente eliminada.

Para obtener las mejores condiciones de depósito se probaron las distintas capas obtenidas sobre los electrodos de carbono vítreo en una disolución que contenía dopamina 0.5 mM y ácido ascórbico 0.5 mM (relación de concentraciones 1:1) en una disolución acuosa a pH 7 (tampón fosfato). La Figura 4 muestra la respuesta voltamétrica de los distintos electrodos: Carbono vítreo desnudos (Figura 4.a) y electrodos modificados con capas de sílice (Figuras 4.b y 4.c).

Con el fin de atestiguar el efecto de la impresión molecular en la detección selectiva de la dopamina, se realizó un depósito de sílice en condiciones parecidas de potencial, en ausencia de la molécula molde, sílice no impresa (electrodo NIP, Figura 4.b) y en presencia de dopamina (MIP, Figura 4.c).

En el caso del electrodo de carbono vítreo se observa un pico de oxidación a +0.64 V correspondiente a la oxidación irreversible del ácido ascórbico. Este pico de oxidación se solapa parcialmente con el pico de oxidación de la dopamina a +0.83 V, por lo que interfiere la correcta determinación amperométrica de esta especie. Cuando se emplean electrodos recubiertos de una capa de sílice se obtienen picos de oxidación mejor definidos en el caso del electrodo NIP y una inhibición parcial del proceso de oxidación del ascórbico con el electrodo MIP.

La selectividad de la detección amperométrica se ha definido en nuestro caso como la relación de corrientes de oxidación de dopamina (pico en torno a 0.8 V) y de ácido ascórbico (pico en torno a 0.6 V), siendo tanto mejor la selectividad cuanto mayor sea este parámetro. La Figura 5 muestra los valores de selectividad obtenidos para distintas capas preparadas a distintos potenciales.

Se observan bajos valores de selectividad (en torno a 1) para los electrodos de carbono vítreo, como cabía esperar. Se observan valores algo mayores de selectividad (en torno a 2) para los electrodos modificados con sílice no impresa (NIP). Sin embargo, los electrodos que presentan mejores valores de selectividad son los de sílice impresa molecularmente (MIP). En concreto las condiciones de depósito óptimas son un potencial de -2.2 V durante 1 min (Figura 5).

La Figura 6 muestra la respuesta voltamperométrica de una disolución que contiene dopamina 0.5 mM y ácido ascórbico 6 mM en una disolución acuosa a pH 7 (tampón fosfato). Los electrodos empleados fueron carbono vítreo pulido (GC) y los electrodos NIP y MIP optimizados.

En el caso del electrodo de carbono vítreo se observa un pico de oxidación a +0.63 V correspondiente a la oxidación irreversible del ácido ascórbico. Este pico de oxidación se solapa con el pico de oxidación de la dopamina a +0.82 V por lo que interfiere la correcta determinación amperométrica de esta especie. Cuando se emplea un electrodo recubierto de una capa de sílice no impresa (electrodo NIP) se definen algo mejor los picos de oxidación de ambas especies pero la corriente de oxidación del ácido ascórbico tiene una intensidad similar a la obtenida con el electrodo de carbono vítreo, lo que indica que esta capa no impide el acceso del interferente a la superficie del elemento transductor. Cuando se realiza la medida con el electrodo impreso se observa que la corriente relacionada a la presencia de ácido ascórbico en disolución prácticamente desaparece pero se mantiene el pico relativo a la oxidación de dopamina. Este resultado indica que el depósito de sílice impresa actúa como filtro altamente selectivo que impide el acceso de la molécula interferente a la superficie del transductor, permitiendo, por el contrario, el paso a las moléculas de dopamina.

Se realizó la detección amperométrica de la dopamina en presencia de interferente, ácido ascórbico en concentración 0.05 M. El electrodo se polariza a un potencial de +0.9 V, potencial al que se produce tanto la oxidación de la dopamina como la del ácido ascórbico sobre los electrodos de carbono vítreo pulido.

La respuesta del electrodo MIP se muestra en la Figura 7. Inicialmente la concentración de dopamina es 0 y al ir adicionando se observa un incremento proporcional de la corriente medida. Sin embargo, si se adiciona más ácido ascórbico en la disolución (10 μ M) no se observan cambios en la corriente.

La Figura 8 muestra cómo la respuesta del sensor es adecuada para el intervalo de concentraciones comprendido entre 100-800 nM en presencia de ácido ascórbico 0.05 M. La relación de concentración Dopamina: Ácido ascórbico en estas medidas está en torno a 1:200000, lo que son condiciones similares o incluso más exigentes a las que se encuentra habitualmente en fluidos fisiológicos.

El sensor tras un número de usos pierde efectividad y es necesario regenerarlo. Para ello se introduce el electrodo en la célula electroquímica de limpieza que contiene una disolución acuosa 0.1 M KCl. Tras aplicar 5 barridos voltamétricos entre +0.2 y +1.0 V se recupera la respuesta inicial del sensor (Figura 9).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un electrodo biomimético que comprende:

- 5 a) mezclar una disolución precursora de sílice con una disolución acuosa que contiene un electrolito soporte, a un pH ácido o básico,
- b) agitar la mezcla de la etapa (a),
- 10 c) añadir a la mezcla obtenida en la etapa (b) una molécula molde,
- d) introducir un electrodo en la mezcla de la etapa (c) y aplicar a dicho electrodo un potencial eléctrico o una corriente eléctrica y
- 15 e) eliminar la molécula molde del electrodo modificado obtenido en la etapa (d).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa (a) la disolución precursora de sílice contiene un alcóxido de silicio.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el alcóxido de silicio se selecciona entre tetraetilortosilano, tetrametoxisilano o combinación de los mismos.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el alcóxido de silicio es tetraetilortosilano.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la disolución precursora además contiene un alcohol.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el alcohol se selecciona entre etanol, metanol, *iso*-propanol, *n*-propanol, butanol o alcohol bencílico.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde el alcohol es etanol.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde en la etapa (a) el electrolito soporte es una sal.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, donde la sal se selecciona de la lista que comprende KCl, NaCl, Na₂SO₄, NaNO₃ o cualquiera de sus combinaciones.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el electrolito soporte se encuentra a una concentración de entre 0.001 y 3 M.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la mezcla de la etapa (a) tiene un valor de pH de entre 0 y 7 empleando un ácido.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde el ácido se selecciona de la lista que comprende HCl, H₂S, H₂SO₄, CH₃COOH, HCOOH, HOOC-COOH, HClO₄ y HNO₃.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde en la etapa (c) la molécula molde se selecciona de la lista que comprende dopamina, epinefrina, ácido úrico, glucosa, colesterol o resveratrol.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde la molécula molde es dopamina o glucosa.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde la molécula molde se encuentra a una concentración de entre 0.001 y 3 M.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde en la etapa (d) el electrodo se selecciona de la lista que comprende carbono vítreo, grafito, diamante dopado con boro, electrodo modificado con nanotubos de carbono, electrodo metálico o electrodo serigrafado de carbono, oro o platino soportado en base cerámica o plástica.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde el electrodo es carbono vítreo u oro.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde en la etapa (d) el potencial eléctrico a aplicar es de entre +0.5 y -3.0 V frente a un electrodo normal de hidrógeno.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, donde el potencial se aplica durante un tiempo de entre 5 s y 30 min.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde en la etapa (d) la corriente eléctrica de reducción a aplicar tiene un valor de entre 0 y -100 mA cm^{-2} .

5 21. Procedimiento según la reivindicación 20, donde la corriente eléctrica se aplica durante un tiempo de entre 5 s y 30 min.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde en la etapa (e) la eliminación de la molécula molde se realiza mediante extracción con un disolvente.

10 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde en la etapa (e) la eliminación de la molécula molde se realiza mediante extracción electroquímica.

15 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde en la etapa (a) además se añade un compuesto organoalcoxisilano que se selecciona de la lista que comprende metiltrietoxisilano, metiltrimetoxisilano, feniltrietoxisilano, viniltrietoxisilano o cualquiera de sus combinaciones.

25. Electrodo biomimético obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

20 26. Uso del electrodo biomimético según la reivindicación 25 para la fabricación de un sensor amperométrico, voltamperométrico, impedimétrico o potenciométrico.

27. Uso según la reivindicación 26, donde el sensor es amperométrico.

25 28. Sensor que comprende el electrodo biomimético según la reivindicación 25.

29. Uso del sensor según la reivindicación 28 para la detección electroquímica de la molécula molde en una muestra.

30

35

40

45

50

55

60

65

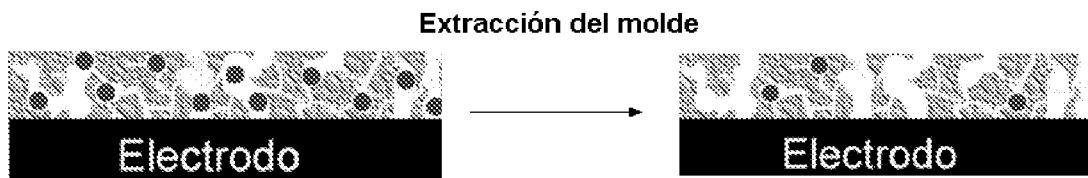


Fig. 1a

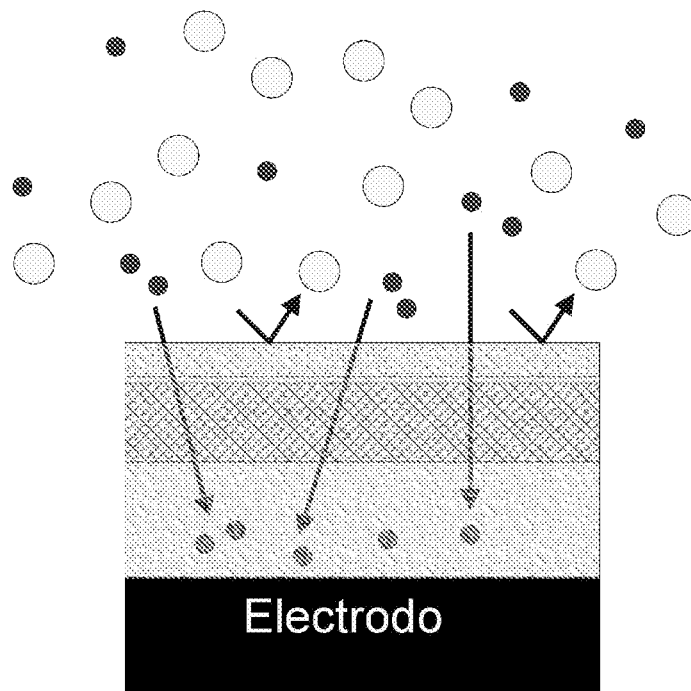


Fig. 1b

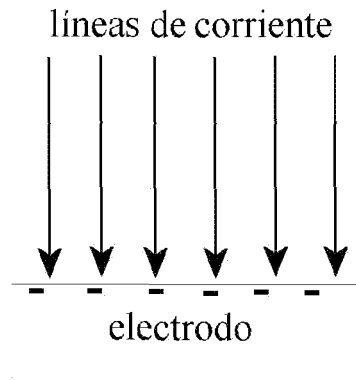


Fig. 2a

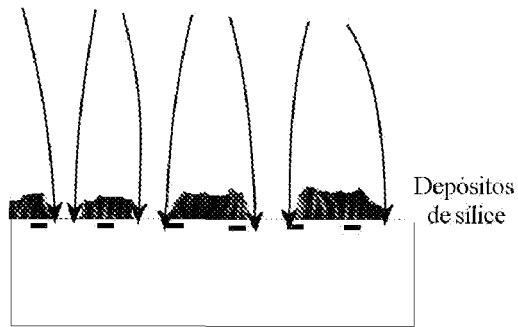


Fig. 2b

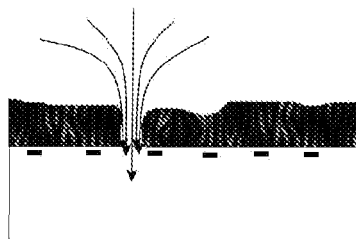


Fig. 2c

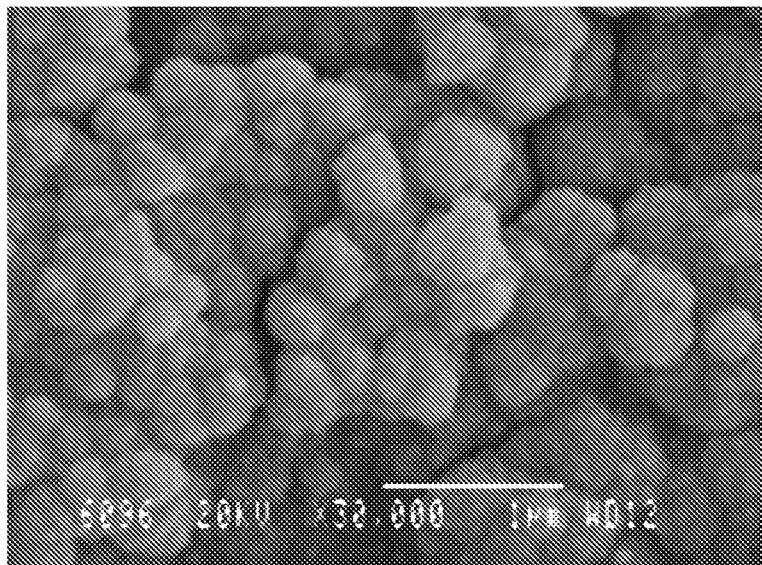


Fig. 3

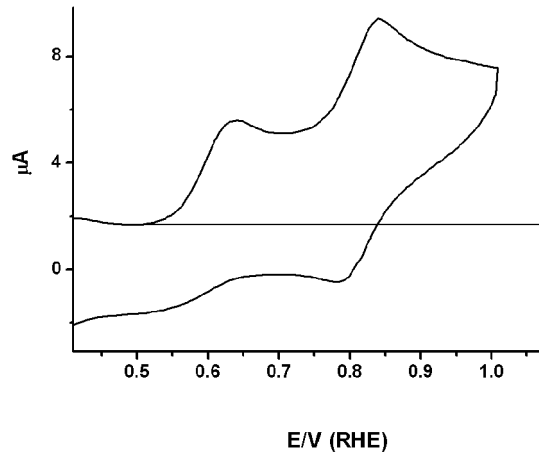


Fig. 4a

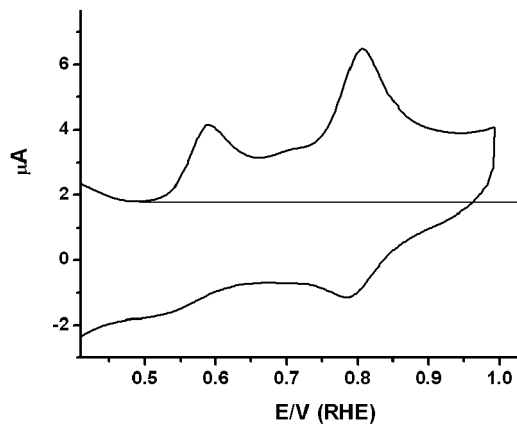


Fig. 4b

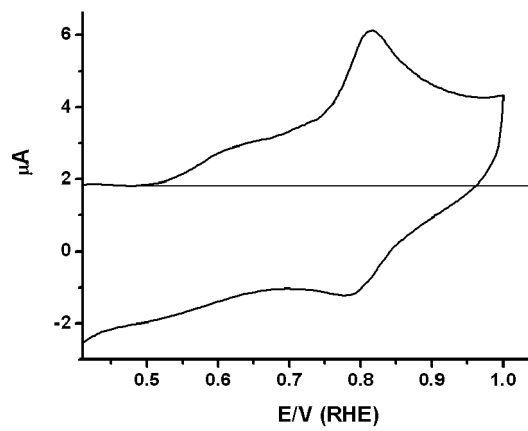


Fig. 4c

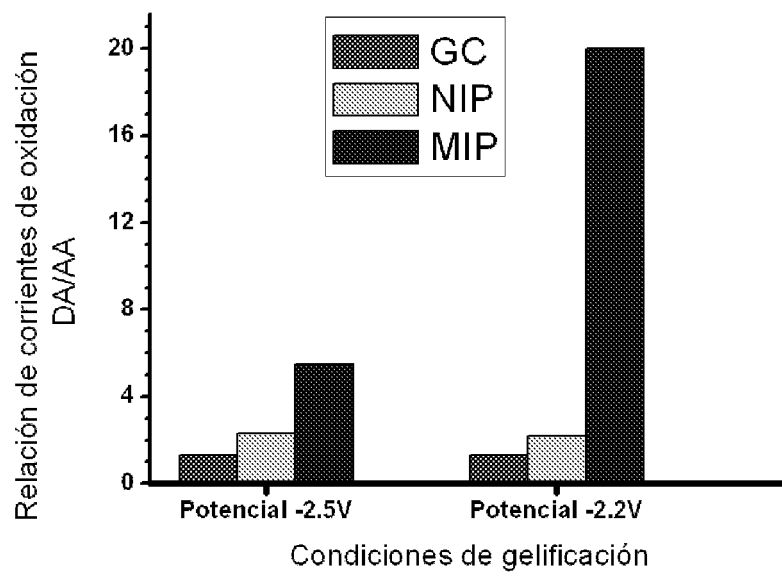


Fig. 5

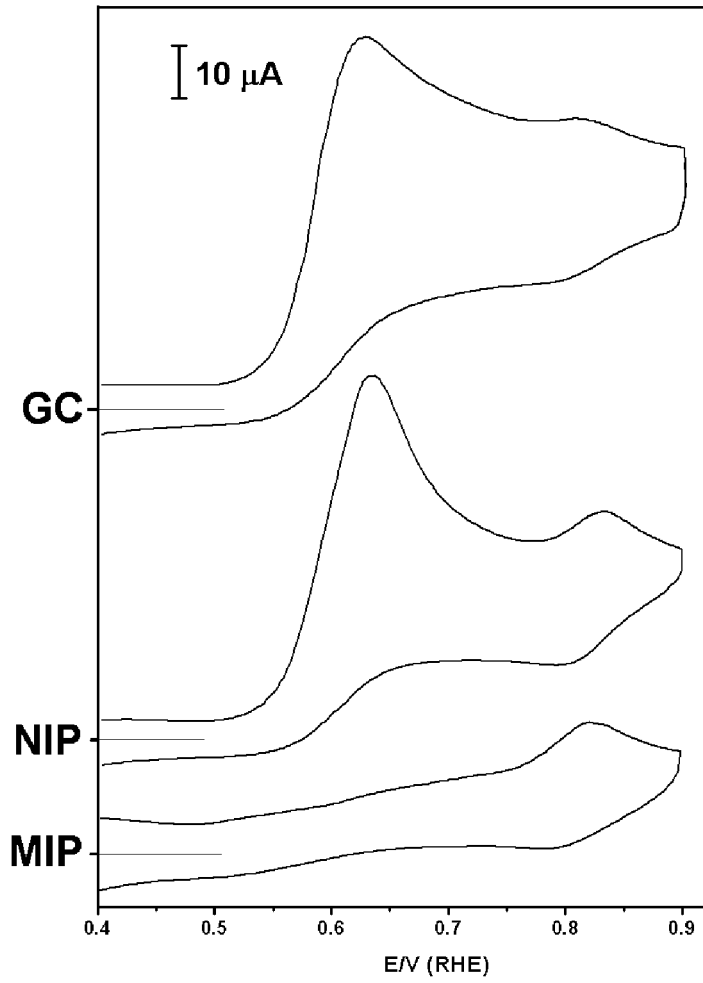


Fig. 6

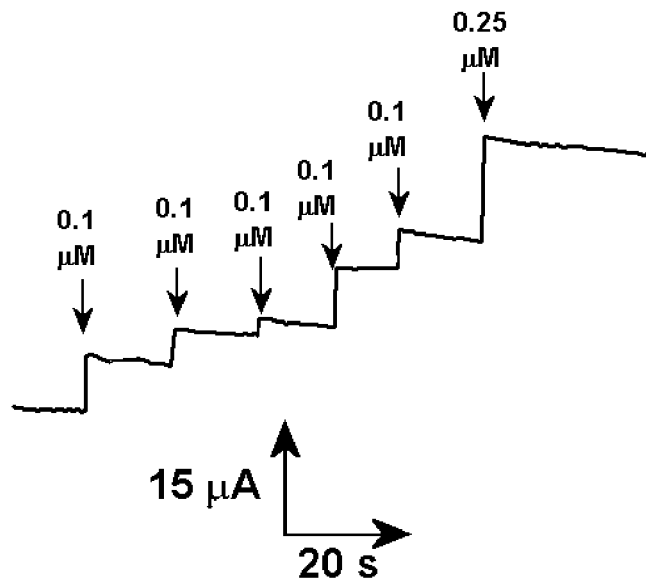


Fig. 7

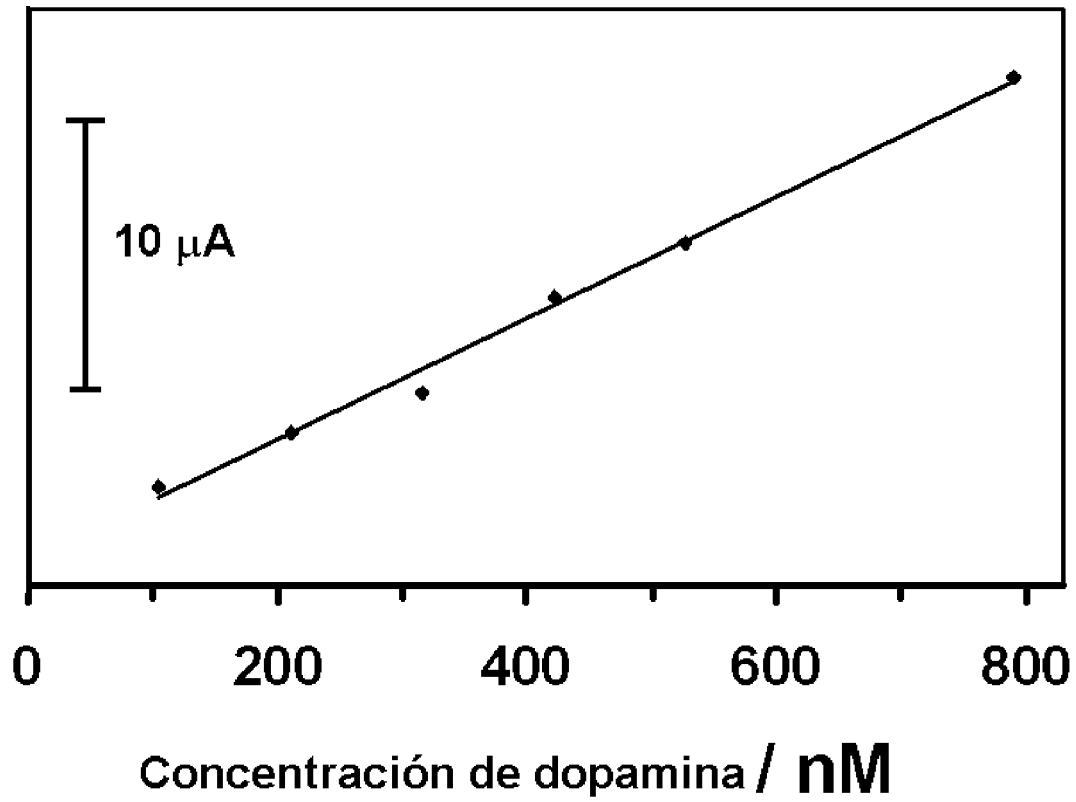


Fig. 8

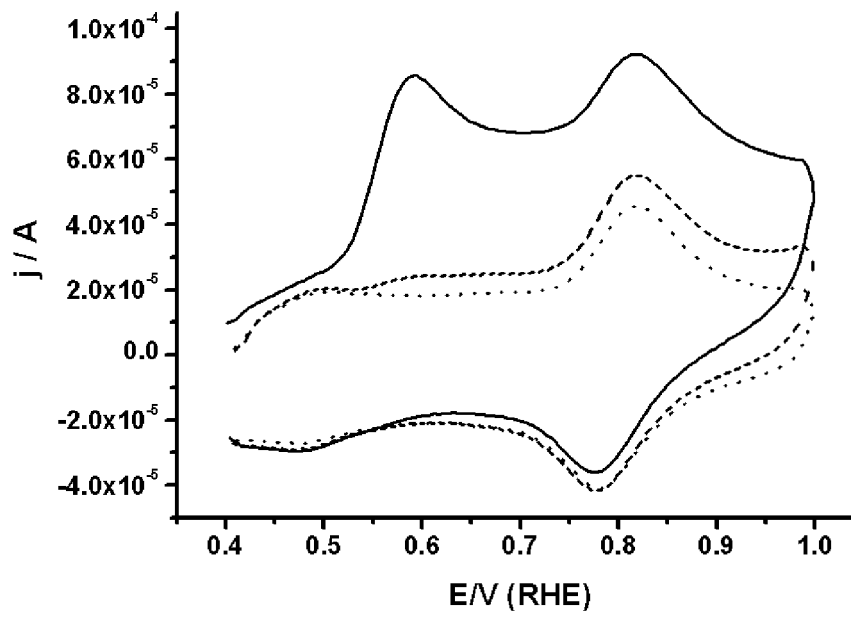


Fig. 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930727

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ATTA, N.F. et al. "Smart electrochemical sensor for some neurotransmitters using imprinted sol-gel films". Talanta, 2009 (disponible en línea 03.08.2009), Volumen 80, páginas 511-518. Ver 1. Introducción; 2. Experimental: 2.3. Preparación del electrodo y procedimientos.	1-29
Y	WO 2008038293 A2 (YISSUM RES DEV CO et al.) 03.04.2008, páginas 4,9,12-16.	1-29
A	LING, T-R et al. "Size-selective recognition of catecholamines by molecular imprinting on silica-alumina gel". Biosensors and Bioelectronics, 2005, Volumen 21, páginas 901-907. Ver 1.Introducción y 2. Experimental.	1-29
A	WO 2008104992 A1 (COUNCIL SCIENT IND RES et al.) 04.09.2008, páginas 11,12.	1-29

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
02.02.2011

Examinador
M. Bautista Sanz

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/552 (01.01.2006)

G01N27/30 (01.01.2006)

C03C3/06 (01.01.2006)

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

C03C, G01N

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

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, XPESP, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-29	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.

Doc.	Número Publicación o Identificación	Fecha Pub.
D01	ATTA, N.F. et al. Talanta, Vol. 80, pp 511-518.	03.08.2009
D02	WO 2008038293 A2	03.04.2008

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 procedimiento de fabricación de un electrodo biomimético mediante recubrimiento con capas de sílice impresas molecularmente, el electrodo y su uso para la fabricación de un sensor, el sensor en el que se incorpora el electrodo y su uso en la detección electroquímica de la molécula molde con la que se ha impreso la sílice.

El documento D01 divulga un procedimiento de preparación de un electrodo para un biosensor mediante recubrimiento de un electrodo de carbono vítreo con sílice híbrida impresa molecularmente con una molécula molde (dopamina, entre otras). El procedimiento consiste en la preparación de una disolución precursora de sílice formada por tetraetilortosilano y feniletosisilano en medio acuoso ácido (HCl). La disolución precursora contiene además un alcohol (2-etoxietanol). A la mezcla sol-gel resultante se le añade una molécula molde (dopamina) y a continuación se recubre un electrodo de carbono vítreo que previamente se activa electroquímicamente. La activación se efectúa por polarización a +1,6V durante 60 segundos y a -1,6V durante el mismo periodo. A continuación se elimina la molécula molde mediante extracción electroquímica (Ver 1. Introducción y 2. Experimental: 2.3. Preparación del electrodo y procedimientos).

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la reivindicación 1 radica en que la aplicación del potencial al electrodo que se va a recubrir se lleva a cabo una vez introducido en la solución precursora de la sílice con una molécula molde como aditivo con la que se va a efectuar el recubrimiento. Esta deposición electroasistida de sílice + aditivo permite modular el espesor y la morfología de la capa de sílice depositada así como su coherencia y reproducibilidad por lo que es importante que el potencial se aplique en el momento de realizar el recubrimiento.

Ya es conocido del estado de la técnica procesos de deposición electroquímica de soluciones sol-gel sobre sustratos conductores que permiten obtener recubrimientos reproducibles y de espesor controlado. De esta manera, el documento D02 divulga un método reproducible de deposición electroquímica de soluciones sol-gel precursoras de sílice (tetraetoxisilano, tetrametoxisilano), que contienen aditivos o materiales encapsulados, sobre diferentes superficies (grafito, superficies metálicas, etc) mediante la aplicación de voltajes comprendidos entre -1,7 y +2,6V sobre dichas superficies, lo que permite un elevado control del espesor (página 4). La solución precursora de la sílice se prepara en medio alcohólico (metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, etc), y contiene un electrolito (NaCl, KCl) que ayuda a reducir la resistencia de la solución (ver páginas 9, 12-16).

De esta forma, un experto en la materia aplicaría un método de deposición electroasistida como el divulgado en el documento D02 al procedimiento de preparación de un electrodo mediante recubrimiento con una solución precursora de sílice recogido en el documento D01 con el fin de obtener un recubrimiento más reproducible y uniforme en cuanto a espesor, con lo que se obtendría el procedimiento divulgado en la solicitud.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 29 carecen de actividad inventiva (Art. 8.1. de la ley de patentes 11/1986).