

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 365**

21 Número de solicitud: 201330735

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

22.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.12.2014

Fecha de la concesión:

11.01.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.01.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/000084

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (50.0%)
CTRA. DE UTRERA, KM. 1
41013 SEVILLA (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE CADIZ (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANTA MONTALVO, Juan Antonio y
EL KAOUTIT ZERRY, Mohammed**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MATERIALES FUNCIONALIZADOS CON NAD⁺ O NADP⁺ Y SU APLICACIÓN EN
BIOSENSORES Y OTROS DISPOSITIVOS**

57 Resumen:

Materiales funcionalizados con NAD⁺ o NADP⁺ y su aplicación en biosensores y otros dispositivos electroquímicos.

La presente invención se refiere a un material funcionalizado que comprende un soporte sobre el que se fija un cofactor NAD⁺, NADP⁺, NADH o NADPH a través del grupo amino de la adenina mediante un grupo puente procedente de epóxidos. Dicho material está destinado a interactuar con las enzimas cofactor dependientes en presencia del sustrato enzimático. Por sus propiedades, este material es útil como bio-electrodo para la elaboración de biosensores a base de enzimas deshidrogenasas así como bio-ánodo en biopilas.

ES 2 525 365 B1

Materiales funcionalizados con NAD⁺ o NADP⁺ y su aplicación en biosensores y otros dispositivos.

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un material con capacidad transductora que comprende un soporte sobre el que se fija un cofactor NAD⁺, NADP⁺, NADH o NADPH a través del grupo amino de la adenina mediante un grupo puente procedente de epóxidos. La ventaja clave de esta invención es que el cofactor en este caso no se desnaturaliza, sino que está covalentemente inmovilizado y reacciona con las enzimas NAD(P⁺)-dependientes en presencia de un sustrato enzimático. Dicho material es adecuado para la obtención de biosensores y otros dispositivos electroquímicos como biopilas o celdas biocombustibles.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El desarrollo de métodos de inmovilización y regeneración de cofactores tipo nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) [también llamados difosfopiridina nucleótido o nucleótido fosfato o/y Co-enzima I] ha sido objeto de un considerable interés científico y tecnológico en las últimas tres décadas. Este interés ha tenido un considerable carácter interdisciplinar debido al importante papel que juegan los dos cofactores de este tipo en la transferencia de electrones entre reacciones metabólicas redox y/o en el funcionamiento de varias enzimas llamados oxido-reductasas, deshidrogenasas o enzimas NAD(P⁺)-dependientes. Así, se pueden destacar como ejemplos áreas como la bioelectroquímica, incluyendo la fabricación de biosensores, el desarrollo de celdas de biocombustible y la producción de bio-baterías, además de otras áreas menos afines como la de síntesis enzimática y la del desarrollo de procesos biotecnológicos para la purificación y la separación de enzimas.

30

Sin embargo la gran limitación a la hora de plantear estos desarrollos ha venido marcada por la dificultad de elaborar bioelectrodos funcionalizados con el cofactor NAD(P⁺) y que este se encuentre accesible para las enzimas en juego, así como que sea reciclable en la superficie del electrodo de manera relativamente duradera.

Varios grupos de investigación en el área de bioelectroquímica han orientado sus esfuerzos a este objetivo. Se han descrito en la bibliografía ejemplos de inmovilización física del cofactor y de las enzimas en una matriz sol-gel (Th. Noguer, D.Szydlowska, J-L, Marty, M. Trjanowicz. Pol. J. Chem 78 (2004) pp. 1679-1689) y acetato de celulosa (S-D. Sprules, J-P. Hart, S-A. Wring, R. Pittson, Anal. Chim. Acta 304 (1995) pp. 74-24) mediante simple encapsulación, y otros químicos usando el 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano para la inmovilización no orientada del cofactor NAD⁺ en una matriz tridimensional de sol-gel (Z. Wang, M. Etienne, F. Quilès, G-W. Kohring, A. Walcarius. Biosens. Bioelectron 32 (2012) pp 111-117) o mediante la realización de enlaces covalentes gracias a grupos funcionales de polímeros como el dextrano (M. Montagné, J-L. Marty. Anal. Chem. Acta. 315 (1995) pp. 297-302), el polietilenglicol (K.K.W. Mak, U. Wollenberger, F.W. Scheller, R. Renneberg. Biosens. Bioelectron 18 (2003) pp. 1059-1100), el quitosano (M. Zhang, C. Mullens, W. Gorski. Anal. Chem 79 (2007) pp. 2446-2450) o la polietilenamina (H. Zheng, J. Zhou, J. Zhang, R. Huang, H. Jia, S. Suye. Microchim. Acta 165 (2009) pp.109-115). Sin embargo, en la mayoría de esos diseños no se han tenido en cuenta varios factores de relevancia. Entre ellos es importante destacar lo siguientes: la conservación del estado nativo del cofactor, la probabilidad de accesibilidad de la enzima al sitio de unión en la estructura del cofactor; y el rendimiento de los biocomponentes introducidos en la matriz de inmovilización.

Para resolver estas limitaciones varios grupos pioneros han propuesto nuevas metodologías de inmovilización orientada del cofactor y de la enzima en varias etapas consiguiendo un diseño del biosensor similar al denominado *layer-by-layer*. En este contexto se han desarrollado diseños de bioelectrodos basados en cadenas moleculares enlazadas entre sí que consisten en secuencias de: electrodo/mediador químico/ cofactor/ enzimas. Sin embargo lo más destacado de estos trabajos es el diseño de un complejo de afinidad entre el cofactor y la enzima. En todos estos ejemplos ello se consiguió gracias a la inmovilización orientada del cofactor en su estado "nativo" mediante el ácido 3-aminofenilborónico que interacciona selectivamente con la unidad ribosa del cofactor. La ventaja que se esgrimido para este diseño es que se deja libre y accesible la unidad nicotinamida, lo que permite justificar una supuesta bioafinidad (Y-M. Yan, O. Yehezkeli, I. Willner. Chem. Eur. J. 13

(2007) pp. 10168-10175; B.L. Hassler, R.M. Worden. Biosens. Bioelectron 21 (2006) pp. 2146-2154). Sin embargo, dada la gran abundancia del grupo ribosa en la naturaleza y la debilidad del enlace hidrógeno establecido entre el grupo boro y los hidróxidos de la subunidad ribosa del NAD(P)^+ , a este sistema se le puede atribuir una cierta inestabilidad en el funcionamiento en continuo, sobre todo en presencia de azúcares ya que esos compuestos pueden sustituir fácilmente el grupo ribosa y establecer otros enlaces hidrógeno con el átomo de boro. Por este motivo es fácil imaginar en este caso un inevitable desprendimiento del cofactor. Para corregir esas desventajas normalmente se intenta la inmovilización mediante entrecruzamiento de la enzima.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

En esta invención se describe un nuevo método de inmovilización del cofactor NAD^+ , NADP^+ , NADH o NADPH en su forma activa y de manera orientada. Mediante este método de inmovilización se ha conseguido establecer enlaces químicos fuertes entre grupos funcionales del cofactor y de la superficie transductora sin dañar el centro de unión del cofactor-enzima.

A diferencia de otras aproximaciones del estado de la técnica, en la presente invención se ha modificado la superficie del sustrato por etapas produciendo de esta forma capas ordenadas de los componentes y aprovechando la gran afinidad que tienen las enzimas en cuestión al cofactor eficientemente inmovilizado y con su sitio de unión orientado hacia la enzima.

En esta invención se consigue la funcionalización de superficies transductoras de la señal física que actúa como sonda para obtener información en tiempo real del estado redox del cofactor en cuestión y para seguir el proceso biocatalítico, lo que hace que presente unas características idóneas para aplicarse a la fabricación de biosensores. En el biosensor obtenido, los biocomponentes resultantes se encuentran en contacto íntimo con el transductor físico. Obviamente este diseño asegura una gran sensibilidad del sistema de medida y se puede aprovechar para utilizar la misma superficie en aplicaciones donde es necesario un reciclaje del mismo cofactor entre varias enzimas.

A diferencia de otros materiales biofuncionalizados similares descritos donde se describe la inmovilización orientada del cofactor NAD(P)^+ mediante su subunidad ribosa y gracias al ácido 3-aminofenilborónico que actúa como puente entre la superficie transductora y el cofactor, en esta invención se inmoviliza el cofactor mediante el uso de grupos epóxicos que reaccionan con el grupo amina de la unidad adenina. En este caso se establecen enlaces químicos fuertes entre el cofactor y la superficie, lo cual conlleva enormes ventajas. Entre ellas la durabilidad, la flexibilidad y la posibilidad de aplicación de la superficie así funcionalizada en varias aplicaciones y diseños. Por ejemplo en este caso no es imprescindible la inmovilización de la enzima y es posible la aplicación de la misma superficie para el control de varios procesos mediante varias enzimas.

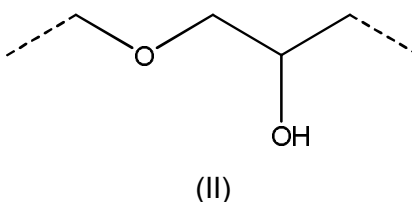
Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un material funcionalizado de fórmula general (I):



donde:

- S es un soporte electródico,
- L es un grupo puente que comprende el grupo de fórmula (II)

20



- C es un cofactor que se selecciona de entre NAD^+ , NADP^+ , NADH o NADPH , caracterizado porque C se une a L mediante un enlace covalente a través del grupo amino primario de la posición 6 de la adenina de C.
- 25

En la presente invención se entiende como soporte “electródico” un material sólido capaz de detectar y/o transmitir el flujo de electrones producido por los cambios de NAD(P)^+ a NAD(P)H o NAD^+ a NADPH después de su reacción con una enzima cofactor dependiente. Este soporte electródico es usado para transmitir señales físicas de cualquier tipo electroquímico, óptico, másica, magnética, etc.

30

Los soportes susceptibles de formar parte del material funcionalizado de la presente invención pueden ser: electrodos convencionales usados en electroquímica como electrodos de metales nobles (oro, platino, plata, paladio...), incluyendo una deposición sobre superficies no conductoras de estos metales vía *sputtering*,
 5 serigrafado o similares, como derivados de carbón y grafito. Entre estos: electrodos de carbono vitrificado y electrodos a base de pastas de grafito, nanotubos de carbono, fullereno, grafeno, carbono negro, fibra de carbono o similares, siempre y cuando se encuentren solidificados con adhesivos tipo (materiales sol-gel, líquidos iónicos, teflón, resina epoxi, etc).

10

También podrán emplearse electrodos transparentes usados convencionalmente en espectro-electroquímica y células solares a base de óxidos de metales de transición (por ejemplo estaño, zinc) sin dopar o dopados con indio o flúor (electrodos ITO, FTO, etc.), así como electrodos ópticos como los anteriores pero basados en fibra óptica, mica, cristal, y similares. Además cualquier sustrato susceptible de usarse en la transducción de las señales físicas como cambios de voltaje, temperatura, peso, resonancia, o/y cualquier cambio en las propiedades físicas del transductor y/o su entorno bio-físico.

20

En una realización preferida, el soporte se selecciona de entre oro, plata, platino o paladio.

En otra realización preferida, el material se selecciona de entre nanotubos de carbono, grafito, grafeno, fullereno o microfibras de carbono.

25

En otra realización preferida, el soporte es un óxido de estaño o zinc dopado con indio o flúor.

30

En otra realización preferida, los posibles soportes anteriormente mencionados se pueden encontrar preferiblemente en forma de nanopartículas.

En otra realización preferida, el soporte comprende un recubrimiento adicional que se une al grupo puente L. En una realización más preferida, este recubrimiento puede ser un polímero o mezcla de polímeros o una capa de silano que ha sido sintetizada

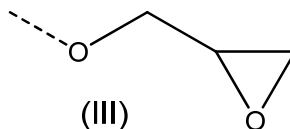
mediante un procedimiento de sol-gel y depositada sobre el electrodo mediante métodos convencionales de modificación de la superficie (*spin-coating*, *dip-coating* o simplemente disolución *casting*).

- 5 En otra realización preferida, el material de la invención además comprende al menos una enzima unida al cofactor C. En una realización más preferida, la enzima es una deshidrogenasa.

10 En otra realización preferida, la enzima está inmovilizada, y más preferiblemente mediante un reactivo de entrecruzamiento como el glutaraldehído o mediante una membrana.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del material funcionalizado descrito anteriormente que comprende las siguientes etapas:

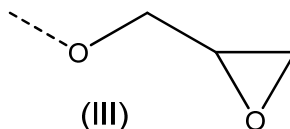
- 15 a) epoxidación del sustrato S mediante un compuesto que comprende al menos un grupo de fórmula (III),



- 20 b) y adición de una disolución del cofactor C al producto obtenido en la etapa (a),
donde S y C se definen como anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del material funcionalizado descrito anteriormente que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) epoxidación del cofactor C con un compuesto que comprende al menos un grupo de fórmula (III):



- b) y deposición del producto obtenido en la etapa (a) sobre un soporte S, donde C y S se definen como anteriormente.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención además comprende una etapa c) de inmovilización de una enzima con afinidad por el cofactor C. En una realización más preferida, la enzima es una deshidrogenasa.

5 El compuesto utilizado en la etapa de epoxidación puede ser un compuesto orgánico, un polímero orgánico o inorgánico, un óxido de metal, nanomateriales de carbono, nanopartículas metálicas y otros materiales siempre y cuando contengan al menos un grupo epóxido o este diseñado para convertirse a este grupo, para reaccionar después con el grupo amino N⁶ de la subunidad adenina del cofactor C. Preferiblemente, el
10 compuesto utilizado en la etapa de epoxidación se selecciona de entre 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, glicidol, epíclorhidrino, polietilenglicol diglicidil éter o 1,4-butanodiol diglicidil éter.

En otra realización preferida, se une al soporte S un recubrimiento que comprende
15 grupos funcionales activos. En una realización más preferida los grupos funcionales activos se seleccionan de entre silanos hidroxilos, aminas o carboxilos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material funcionalizado descrito anteriormente para la fabricación de biosensores, bioelectrodos, biopilas, biobaterías o
20 celdas de biocombustibles.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un biosensor que comprende el material funcionalizado descrito anteriormente.

25 En la presente invención se entiende como biosensor un dispositivo con capacidad para medir parámetros biológicos o químicos. Consta de al menos tres componentes básicos que son el material funcionalizado descrito anteriormente, que actúa como sensor biológico, un transductor que acopla los otros componentes y traduce la señal emitida por el sensor y el detector que puede ser óptico, piezoeléctrico, térmico,
30 magnético, etc.

El funcionamiento del biosensor de la presente invención se basa en los mecanismos de oxidación de la enzima sobre el sustrato, y la reducción del cofactor de NAD(P)⁺ a

NAD(P)H. Este movimiento de electrones y H^+ es detectado por el soporte y transmitido al transductor.

Los sistemas de transducción usados en la presente invención pueden ser en base a la detección de los cambios:

- a) en el estado redox del cofactor C, de manera directa o indirecta (usando un mediador bio-químico), como en los procesos de transducción amperométrico y ópticos.
- b) en el estado físico de la superficie S-L-C, comparando parámetros (como el peso, la resonancia, la conductividad, el potencial, el momento magnético...) antes y después de la interacción de la superficie con la enzima C-dependiente o/y un complejo de ellas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una biopila enzimática de combustible, llamada así porque en los electrodos de la pila intervienen enzimas redox en el ánodo y el cátodo. La energía en este caso se genera gracias al establecimiento de una diferencia de potencial entre los dos electrodos, lo cual es debido a la oxidación del cofactor enzimático o de un complejo cofactor-mediador en el compartimento anódico y a la reducción del oxígeno en el comportamiento catódico

En la biopila de la presente invención, el ánodo es el material funcionalizado anteriormente el cual reacciona con una mezcla de enzimas y al menos un biocombustible, siempre y cuando al menos una de las enzimas es C-dependiente. En este caso el ánodo es el material en forma de complejo S-L-C-E realizado a partir de S-L-C, donde E es una enzima C-dependiente selectiva del biocombustible.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la determinación cualitativa y/o cuantitativa del sustrato de una enzima en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto dicha muestra con el biosensor anteriormente descrito,
- b) someter el biosensor a condiciones que resulten en una señal electroquímica,
- c) medir la señal electroquímica obtenida en (b) y
- d) determinar cualitativa y/o cuantitativamente el sustrato a partir de la medida de la señal electroquímica.

De manera más concreta, este método comprende las siguientes etapas para realizar una medida electroquímica:

- 5 a) colocar el biosensor anteriormente descrito, en posición de electrodo de trabajo en una celda electroquímica, generalmente compuesta además del electrodo de trabajo de un electrodo referencia y un electrodo auxiliar.
- b) Rellenar la celda electroquímica con una disolución de medida, cuya composición depende de las enzimas.
- c) Polarizar si así se prefiere el biosensor a un potencial determinado.
- 10 d) Inyectar la muestra a medir en la celda electroquímica.
- e) Medir la señal electroquímica obtenida en (d).
- f) Determinar cualitativa y/o cuantitativamente el sustrato a partir de la medida de la señal electroquímica.

15 De otra forma más detallada, este procedimiento puede realizarse de la siguiente manera:

- a) Poner en contacto el biosensor descrito anteriormente con una disolución de medida.
- b) Someter el producto obtenido en la etapa (a) a condiciones de transducción capaces de controlar el estado redox del compuesto C o la bio-afinidad de C con las enzimas C-dependientes.
- 20 c) Inyectar a la disolución de medida una mezcla de enzimas, donde al menos una de ellas es C-dependiente.
- d) Seguir controlando y registrando la señal input indicativa del estado redox de C o de la sucesión de la bio-afinidad C enzima C-dependiente.
- 25 e) Inyectar una muestra que contiene un sustrato a determinar.
- f) Y finalmente correlacionar la diferencia entre las señales input obtenidas en la etapas d y e con la concentración del sustrato.

En este caso las etapas c) y d) pueden figurar invertidas.

30

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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1: representa las reacciones implicadas en el mecanismo de transducción de la señal electroquímica.

Figura 2: representa la respuesta electro-catalítica registrada en modo amperométrico del biosensor de glucosa (realizado según el ejemplo 1) en presencia del azul de meldola y varias concentraciones de glucosa.

Figura 3: representa la recta de calibración de la glucosa, obtenida a partir de los datos de corriente registradas a 10 s en el amperograma de la Figura 2. Representa también las características analíticas de esta recta y el límite de detección (LOD) del biosensor de la glucosa.

Figura 4: representa la respuesta electro-catalítica registrada en modo cronoamperométrico del biosensor de alcohol (realizado según el ejemplo 1) en presencia del azul de meldola y varias concentraciones de alcohol.

Figura 5: representa la recta de calibración del porcentaje en volumen del alcohol, en una muestra obtenida a partir de los datos de corriente registradas en el cronoamperograma de la Figura 4. Figuran también las características analíticas de esa recta y el límite de detección (LOD) del biosensor del alcohol.

Figura 6: representa la respuesta electro-catalítica registrada en modo cronoamperométrico del biosensor de ácido málico (realizado según el ejemplo 1) en presencia del azul de meldola y varias concentraciones de ácido málico.

Figura 7: representa la respuesta electro-catalítica registrada en modo cronoamperométrico del biosensor de glucosa desarrollado en el ejemplo 3 en presencia de varias concentraciones del analito.

EJEMPLOS

30

Ejemplo 1: obtención del material de la invención con un soporte de oro mediante hidroxilación previa del mismo.

La hidroxilación de electrodos de oro se realizó primeramente gracias a la deposición

de una capa de silano sintetizado vía sol-gel. La epoxidación de esta nueva superficie con grupos epoxi se llevó a cabo mediante reacción con el 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPS), mientras que la inmovilización orientada del cofactor se ha llevado a cabo mediante la reacción del grupo epóxido y el amino (N⁶) de la unidad adenina.

En un vaso de reacción se colocaron 5 mL de agua Mili-Q, se le añadieron 1,93 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) (CAS: 78-10-4 sigma-aldrich) y bajo agitación magnética se procedió a la adición de 6,25 mL de una disolución de ácido clorhídrico 0,01M gota a gota como catalizador ácido. El conjunto se dejó en agitación durante 10 horas, suficientes para obtener una disolución totalmente miscible. Después de una dilución por un factor de 3, para obtener una concentración final de Si igual a 0,25M, se tomó un volumen preciso y se depositó sobre un electrodo previamente lavado y secado según los métodos convencionales. El volumen a depositar se ha optimizado en 0,7 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$; donde el denominador corresponde a la superficie geométrica del electrodo. La gota depositada se secó durante dos horas a temperatura ambiente y después a 200°C durante 10 min para evaporar todo el etanol generado y finalizar los procesos de condensación del sol-gel. Después de esta etapa, se enfrió el electrodo en el desecador y se sumergió en una disolución de tolueno que contiene 0,17 mol/L de 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPS), (CAS: 2530-83-8 Sigma-Aldrich). A continuación se dejó en agitación toda la noche y al final se secó a temperatura ambiente. Con estos procesos se consiguió la funcionalización del electrodo con grupos epoxi, paso previo para la etapa de inmovilización orientada del NAD(P)⁺.

Para la inmovilización de cofactor, se preparó una disolución de NAD⁺ 2mg/mL a pH básico, se introdujo en ella el electrodo y se dejó reaccionar un mínimo de 24 horas en agitación y a temperatura ambiente. Después de este tiempo se tomó el electrodo, se lavó suavemente con agua, y se realizó la bioafinidad entre el cofactor y la enzima específica al analito de interés. Finalmente se procedió a la inmovilización de la enzima mediante procesos convencionales: usando el glutaraldehído (diluido en agua a un porcentaje del 0,5%) como agente de entrecruzamiento o simplemente mediante retención bajo una membrana de diálisis fijada mediante una junta tórica.

Siguiendo este procedimiento se pusieron a punto tres biosensores prototipo:

biosensor de glucosa basado en la glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), biosensor de etanol basado en el alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) y biosensor de ácido málico basado en la malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37). Cabe recalcar que para el buen reciclaje del cofactor, en todos estos prototipos se usó la enzima diaforasa (EC 1.8.1.4) la cual fue inmovilizada mediante el mismo proceso junto con las enzimas en cuestión y después de la realización de la bioafinidad con el cofactor inmovilizado.

El mecanismo de generación de la señal electroquímica en presencia del sustrato y las gráficas de respuestas registradas por los biosensores desarrollados en este ejemplo están ilustrados en las figuras (1-6). Los datos de medida se obtuvieron en una celda electroquímica, dotada de tres electrodos; referencia, auxiliar y de trabajo (plata /cloruro de plata, platino y el biosensor fabricado según la descripción, respectivamente) y usando un potenciostato (PalmSens Electrochemical Sensor Interfaces, Palm Instruments B.V. Holanda) dotado de software propio para el establecimiento de la señal de excitación del sistema y para el registro de la respuesta electroquímica. Los métodos electro-analíticos usados en estos ejemplos fueron las medidas amperométricas y/o crono-amperométricas, llamados así porque consisten en establecer una diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo y en registrar la evolución de la corriente con el tiempo entre este mismo electrodo y el electrodo auxiliar.

En todos los casos de este ejemplo, la celda contiene una disolución tampón fosfato pH 7 y una cantidad de azul de meldola igual a 0,1 mmolar. En la figura 2 se demuestran resultados de amperogramas obtenidos mediante el biosensor de glucosa. Para realizar esas medidas se añade a la disolución de medida un volumen calculado de una disolución patrón de glucosa, se establece una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia igual a 50 mV y se registra la variación de corriente entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. El sistema bajo continua polarización alcanza una corriente límite independiente del tiempo llamada también corriente difusional o corriente de Cottrell. Esta corriente es directamente proporcional a la concentración de la glucosa por lo que la recta de calibrado ilustrada en la figura 3 se obtuvo directamente correlacionando la corriente registrada a un tiempo de 10s suficiente para alcanzar la corriente límite con la concentración de glucosa presente en la celda (0, 0,1; 0,4; 0,6; 1 g/L).

En el resto de los casos, biosensores de alcohol y de ácido málico, se han usado las medidas cronoamperométricas. Después de introducir los tres electrodos en la celda de medida que contiene el buffer y el mediador, se polariza el electrodo de trabajo a un potencial de 50 mV (vs Ag/AgCl) y se registra la evolución de la corriente producida. El sistema bajo continua polarización se establece alcanzando la misma corriente límite. Al inyectar el sustrato enzimático en la celda se produce re-oxidación del mediador electroquímico en la superficie del electrodo lo cual se traduce en saltos de la corriente registrada como lo destacan las figuras 3 y 5. La magnitud de esos saltos es directamente proporcional a la concentración del sustrato enzimático y sirve para elaborar las rectas de calibrado directamente como ilustra figura 4.

En el caso de optar por no inmovilizar las enzimas, esas sustancias fueron retenidas con una junta tórica o se han añadido directamente en la celda electroquímica. El seguimiento de la actividad enzimática se ha realizado mediante registro de las mismas curvas cinético-electroquímicas.

Ejemplo 2: obtención del material de la invención con un soporte de oro mediante epoxidación directa del mismo.

A un electrodo de oro se le aplicó una reducción con agua regia para generar grupos OH en su superficie, después se secó en un ambiente de nitrógeno y se introdujo inmediatamente en una disolución de tolueno que contiene 0,17 mol/L de GPS que se dejó toda la noche en agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. Con este proceso se realizó la hidrólisis del organosilano dando lugar a una superficie de oro dotada de grupos epoxi. Este mismo electrodo se introdujo en una disolución de 2 mg/mL de NAD⁺ a pH básico y se procedió a la inmovilización orientada de este cofactor durante un mínimo de 24h a temperatura ambiente. La inmovilización de las enzimas se realizó como en el ejemplo anterior.

Ejemplo 3: obtención del material de la invención con un soporte de nanopartículas de sílice mediante funcionalización de las mismas en una suspensión coloidal.

Siguiendo la misma química base de los ejemplos 1 y 2, la funcionalización de nanopartículas con grupo epoxi y su reacción con el cofactor puede tener lugar también en una suspensión coloidal. Esto se ha llevado a cabo mediante el siguiente procedimiento: 3,025 mmoles de TEOS correspondiente a 0,674 mL se añadieron a una disolución de etanol 21,37 mL, y a continuación se añadieron 1,07 mL del catalizador amoniaco gota a gota bajo agitación magnética y se dejó la reacción en proceso durante 8h. Al terminar este tiempo se procedió a un secado en placa calefactora a 80°C para la evaporación de todo el etanol. Una vez recuperado el sólido se tomaron 25 mg y se disolvieron en 10 mL de tolueno. A esta disolución se le añadió 0,25 mL de GPS previamente disuelto en 0,75 mL de tolueno. El conjunto se dejó reaccionar a reflujo entre 70 y 80°C toda la noche. Después de esta etapa se procedió a la evaporación del tolueno bajo presión reducida, se recuperó el sólido y se lavó con metanol varias veces mediante una centrifugación a 2000g durante 4 min. A continuación se procedió a la inmovilización orientada del cofactor NAD(P)⁺ como en los ejemplos 1 y 2. Al resultado de esa reacción se le aplicó una diálisis con una membrana de 2000. Se extrajo el producto y se guardó en el refrigerador para aplicarlo directamente sobre la superficie del electrodo previamente lavado. Se aplicó 5 µL de esta suspensión a un electrodo de carbono vitrificado (Metrohm AG 3mm) y se añadieron también las enzimas (en concreto la glucosa deshidrogenasa y la diaforasa). Seguidamente se añadió el mediador químico tetratiafulvaleno (TTF), (CAS nº 31366-25-3) y se aplicó la retención en una membrana de diálisis (10000) sujeta con una junta tórica. Ejemplo de las curvas crono-amperometricas en presencia del analito están ilustrados en las figura 7. Las medidas fueron realizadas como en el ejemplo 1, salvo que en este caso no fue necesario añadir el mediador a la disolución tampón y que el potencial aplicado fue igual a 100mV vs Ag/AgCl.

REIVINDICACIONES

1. Material funcionalizado de fórmula general (I):

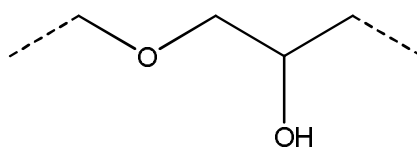
$$S-L-C$$

$$(I)$$

5

donde:

- S es un soporte electródico,
- L es un grupo puente que comprende el grupo de fórmula (II)



10

$$(II)$$

- C es un cofactor que se selecciona de entre NAD^+ , $NADP^+$, $NADH$ o $NADPH$, caracterizado porque C se une a L mediante un enlace covalente a través del grupo amino primario de la posición 6 de la adenina de C.

15

2. Material según la reivindicación 1 donde el soporte S se selecciona de entre metales nobles, materiales de carbono, óxidos de metales de transición, dopados o sin dopar, fibra óptica, polímeros, mica, vidrio, silicio o sílice.

3. Material según la reivindicación anterior donde el soporte se selecciona de entre oro, plata, platino o paladio.

4. Material según la reivindicación 2 donde el material se selecciona de entre nanotubos de carbono, grafito, grafeno, fullereno o microfibras de carbono.

25

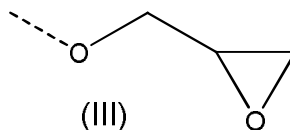
5. Material según la reivindicación 2 donde el soporte es un óxido de estaño o zinc dopado con indio o flúor.

6. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el soporte se encuentra en forma de nanopartículas.

30

7. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el soporte comprende un recubrimiento adicional que se une al grupo puente L.
8. Material según la reivindicación 7 donde el recubrimiento es un polímero o mezcla de polímeros.
9. Material según la reivindicación 7 donde el recubrimiento es una capa de silano sintetizada mediante sol-gel.
10. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende al menos una enzima unida al cofactor C.
11. Material según la reivindicación 10 donde la enzima es una deshidrogenasa.
12. Material según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la enzima está inmovilizada.
13. Material según la reivindicación anterior donde la enzima está inmovilizada mediante un reactivo de entrecruzamiento o mediante una membrana.
14. Procedimiento de obtención del material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende las siguientes etapas:
- epoxidación del sustrato S mediante un compuesto que comprende al menos un grupo de fórmula (III),
- (III)
- y adición de una disolución del cofactor C al producto obtenido en la etapa (a),
- donde S y C se definen como en la reivindicación 1.
15. Procedimiento de obtención del material cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende las siguientes etapas:

- a) epoxidación del cofactor C con un compuesto que comprende al menos un grupo de fórmula (III):



- b) y deposición del producto obtenido en la etapa (a) sobre un soporte S, donde C y S se definen como en la reivindicación 1.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 que además comprende una etapa c) de inmovilización de una enzima con afinidad por el cofactor C.
17. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la enzima es una deshidrogenasa.
18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-17 donde el compuesto utilizado en la etapa de epoxidación se selecciona de entre 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, glicidol, epiclorhidrino, polietilenglicol diglicidil éter o 1,4-butanodiol diglicidil éter.
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14-18 en el que se une al soporte S un recubrimiento que comprende grupos funcionales activos.
20. Procedimiento según la reivindicación anterior donde los grupos funcionales activos se seleccionan de entre silanos, hidroxilos, aminas o carboxilos.
21. Uso del material funcionalizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de biosensores, bioelectrodos, biopilas, biobaterías o celdas de biocombustibles.
22. Biosensor que comprende el material funcionalizado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

23. Biopila que comprende el material funcionalizado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
24. Método para la determinación cualitativa y/o cuantitativa del sustrato de una enzima en una muestra que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) poner en contacto dicha muestra con el biosensor de la reivindicación 22,
b) someter el biosensor a condiciones que resulten en una señal electroquímica,
c) medir la señal electroquímica obtenida en (b) y
d) determinar cualitativa y/o cuantitativamente el sustrato a partir de la medida de
10 la señal electroquímica.
25. Método según la reivindicación 24 que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto el biosensor de la reivindicación 22 con una disolución de medida,
15 b) someter el producto obtenido en la etapa (a) a condiciones de transducción capaces de controlar el estado redox del compuesto C o la bio-afinidad de C con las enzimas C-dependientes,
c) inyectar a la disolución de medida una mezcla de enzimas, donde al menos una de ellas es C-dependiente,
20 d) seguir controlando y registrando la señal input indicativa del estado redox de C o de la sucesión de la bio-afinidad C enzima C-dependiente,
e) inyectar una muestra que contiene un sustrato a determinar y
f) correlacionar la diferencia entre las señales input obtenidas en la etapas d y e con la concentración del sustrato.
25
26. Método según la reivindicación 24 que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto el biosensor de la reivindicación 22 con una disolución de medida,
b) someter el producto obtenido en la etapa (a) a condiciones de transducción
30 capaces de controlar el estado redox del compuesto C o la bio-afinidad de C con las enzimas C-dependientes,
c) seguir controlando y registrando la señal input indicativa del estado redox de C o de la sucesión de la bio-afinidad C enzima C-dependiente,

- d) inyectar a la disolución de medida una mezcla de enzimas, donde al menos una de ellas es C-dependiente,
 - e) inyectar una muestra que contiene un sustrato a determinar y
 - f) correlacionar la diferencia entre las señales input obtenidas en la etapas d y e
- 5 con la concentración del sustrato.

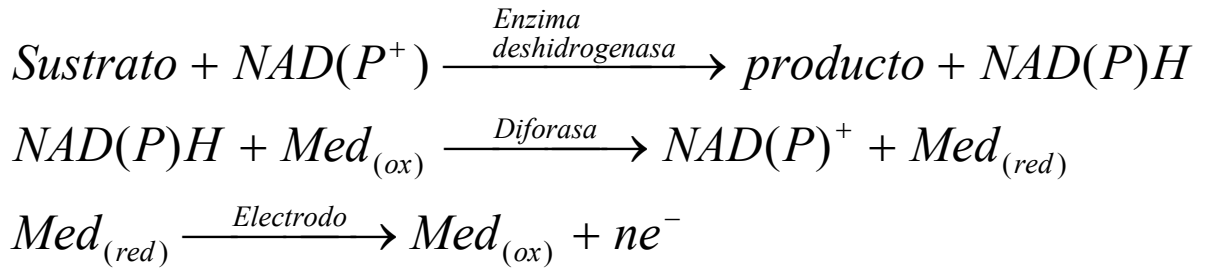


FIG. 1

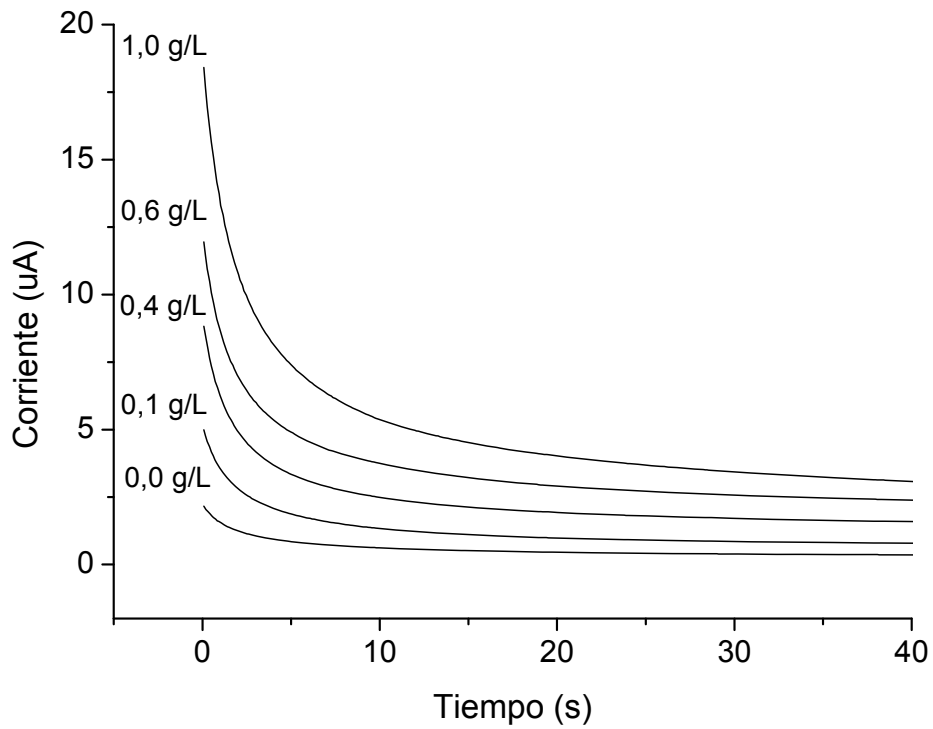


FIG. 2

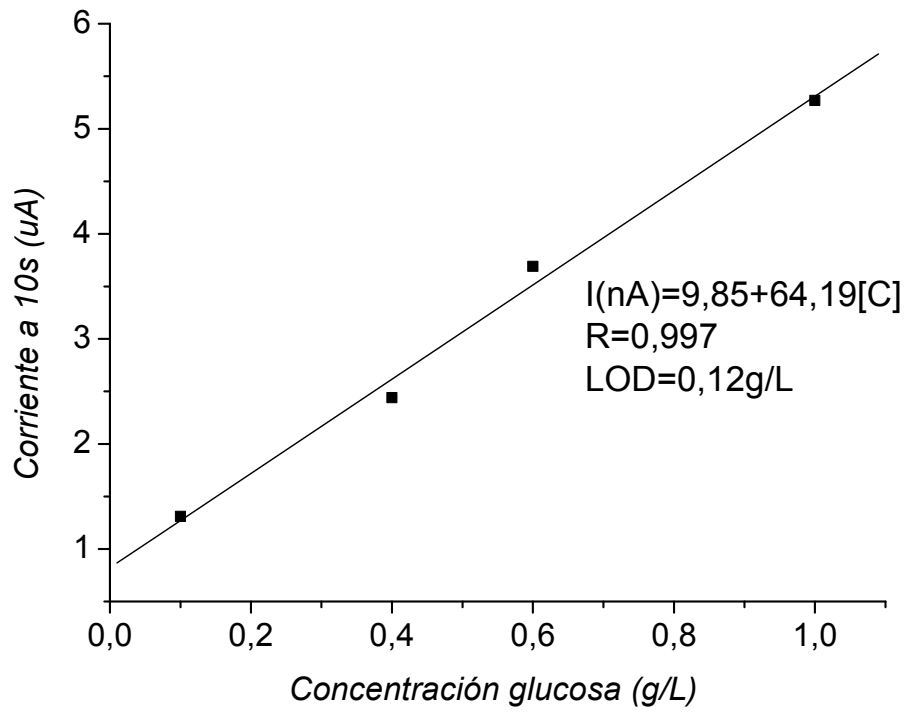


FIG. 3

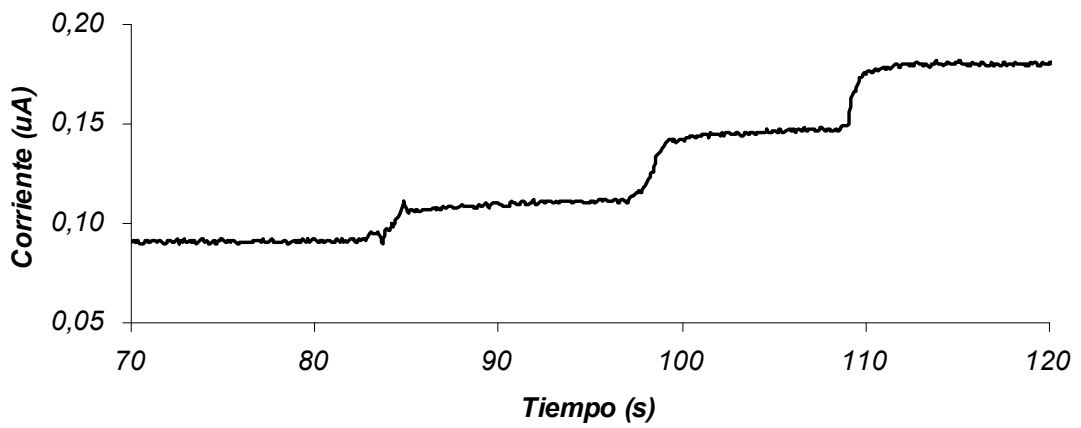


FIG. 4

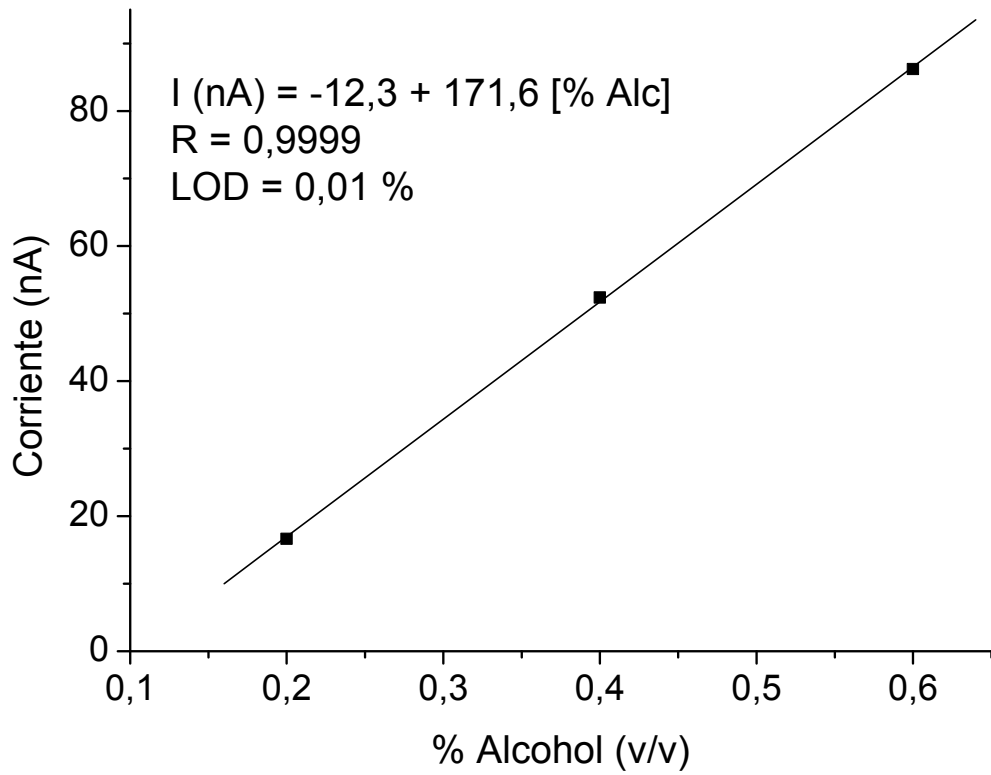


FIG. 5

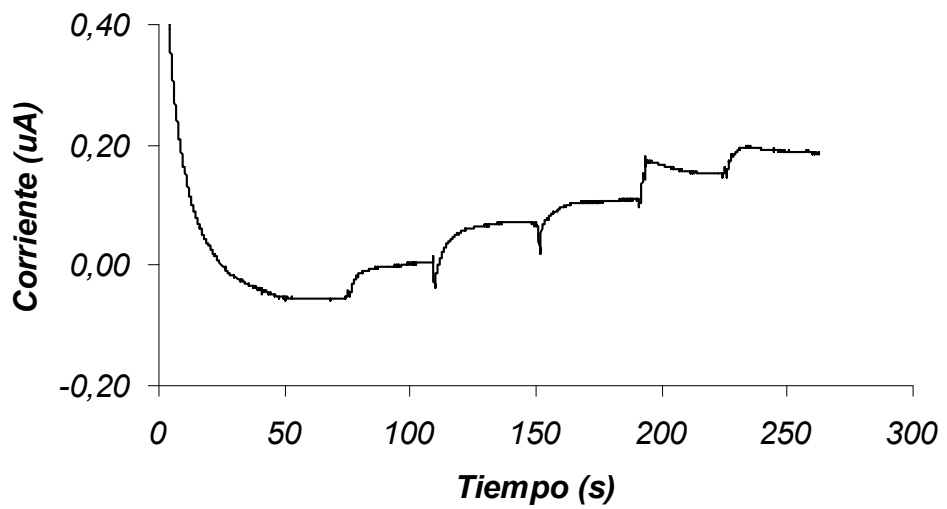


FIG. 6

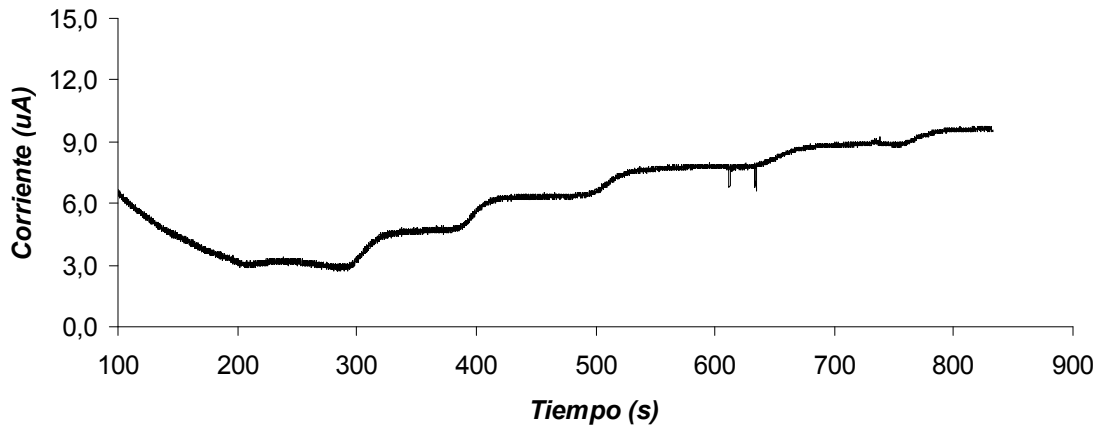


FIG. 7