

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 668**

21 Número de solicitud: 201631683

51 Int. Cl.:

**G01N 33/483** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**23.12.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.07.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070831**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ HERNANDEZ, Juan;  
GALLARDO RUIZ, Alberto;  
FERNÁNDEZ-MAYORALAS, Alfonso y  
BASTIDA CODINA, Agatha**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MICROCHIPS POROSOS FUNCIONALIZADOS Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE  
SENSORES**

57 Resumen:

Microchips porosos funcionalizados y su uso en la elaboración de sensores.

La presente invención se refiere a microchips con un circuito impreso en su superficie formado por una boca de entrada y otra de salida comunicadas y con un material poroso contenido dentro de este circuito que se ha obtenido mediante la técnica de evaporación del disolvente (breath figures) y en cuyos poros contiene moléculas activas ancladas mediante interacciones del tipo host-guest.

**ES 2 676 668 A1**

**Microchips porosos funcionalizados y su uso en la elaboración de sensores**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a microchips con un circuito impreso en su superficie formado por una boca de entrada y otra de salida comunicadas y con un material poroso contenido dentro de este circuito que se ha obtenido mediante la técnica de evaporación del disolvente (*breath figures*) y en cuyos poros contiene moléculas activas ancladas mediante interacciones del tipo *host-guest*.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los microdispositivos han incrementado su presencia en el día a día, especialmente en forma de microdispositivos electrónicos y sensores micro-electro-mecánicos, formando parte de objetos tan cotidianos como teléfonos móviles, juguetes, electrodomésticos o automóviles. El éxito de este tipo de dispositivos se debe a factores como su velocidad de respuesta, su diseño compacto, la posibilidad de producirse en serie a precios razonables y el bajo consumo energético derivado de su uso.

20

Dentro de este proceso de miniaturización, la microfluídica (del inglés *microfluidics*), se ha encargado de entender cómo se puede manipular y analizar fluidos a escala micrométrica, consiguiendo así reducir significativamente el volumen de las muestras empleadas. Posteriormente, se empezaron a desarrollar sistemas microfluídicos capaces de integrar funciones en el propio chip. Estos sistemas, que se conocen con el término "laboratorio en un chip" (del inglés "*lab on a chip*" o "MicroTAS", TAS = *total analysis system*), permiten la incorporación de distintas funcionalidades dentro de un único dispositivo microfluídico, lo que facilita la ejecución de varios procesos en cadena. Como resultado, están siendo empleados en una amplia gama de aplicaciones, especialmente en el campo de la bioquímica y la biomedicina, habiendo servido, entre otros, como herramienta para análisis celulares, incubación de tejidos o estudios del genoma.

30

Sin embargo, pese a las ventajas que brindan los dispositivos "lab on a chip", el desarrollo de este tipo de sistemas sigue requiriendo: por un lado, aumentar la versatilidad de los procesos productivos empleados en su fabricación (su fabricación

35

utiliza en la actualidad procesos costosos como la litografía); por otro lado, requieren de nuevos procesos de funcionalización de los microcanales que permitan llevar a cabo los procesos deseados tales como reacciones, inmovilizaciones selectivas o procesos de reconocimiento.

5

En los últimos años, se han desarrollado sofisticados métodos para obtener superficies porosas y funcionalizadas. Dentro de estas, la técnica de evaporación del disolvente (*breath figures* en inglés), es una alternativa interesante, de bajo coste y sencilla, que permite el diseño de materiales porosos sobre los que se puede controlar el tamaño de poro. La formación de los poros en esta técnica ocurre cuando se mantiene una solución polimérica en un disolvente volátil dentro de una cámara cerrada con alta humedad relativa. Durante la evaporación del disolvente, la interfase disolvente/aire se enfría y las gotas micrométricas de agua se condensan sobre la superficie. Finalmente, la evaporación de las gotas de agua depositadas conduce a la formación de un film poroso que presenta una ordenación hexagonal simulando el patrón de un panal de miel. En el documento de Rodríguez-Hernández et al (*Journal of Colloid and Interface Science* 457 (2015) 272–280) se describe la formación de un material polimérico de estireno modificado con ciclodextrina obtenido por la técnica de evaporación del disolvente, el cual se funcionaliza con poliacrilato modificado con adamantano unidos por interacciones de tipo *host-guest* sobre las ciclodextrinas ancladas en los poros. En el documento *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 12210–12219, se describe la obtención de catalizadores enzimáticos obtenidos por la técnica de evaporación del disolvente que se funcionalizan mediante el anclaje no covalente de la enzima ALP a los poros.

25

La funcionalización de materiales porosos en general y en particular de este tipo de materiales dentro de un dispositivo microfluidico ha sido tratada en muy pocas ocasiones. En la mayoría de los casos el tratamiento de dispositivos microfluidicos requiere la utilización de métodos particulares de modificación normalmente utilizando más de una etapa. Así, procesos de activación superficial utilizando luz UV o bien mediante tratamientos con ozono son requeridos para crear grupos funcionales en los que poder inmovilizar la molécula deseada. Además la localización o el control de la densidad de grupos inmovilizados es difícil de controlar. La densidad de grupos también puede ser variada en función de la cantidad de polímero funcional incorporado en la mezcla inicial.

35

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado una estrategia para la preparación de materiales porosos utilizando dos componentes: uno es la matriz y el otro un copolímero que  
5 tiene los grupos funcionales deseados. Esta estrategia permite:

- Control de la densidad de grupos funcionales
- Modificación selectiva dentro y/o fuera del poro
- Utilización de poco copolímero funcionalizado (más caro que la matriz)
- Posibilidad de tener más de un grupo funcional dentro del poro
- 10 - Un canal poroso implica una mayor área superficial y una mejor: actividad catalítica, respuesta a la detección etc. dependiendo del uso final que le demos.

Otras ventajas de este método son: la rapidez (los poros se forman en menos de un  
15 minuto), el coste (ningún equipamiento costoso, solo una cámara húmeda), modularidad (tratamiento de todo tipo de sustratos orgánicos, inorgánicos), versatilidad (se podría hacer un chip en el que la parte detectora (porosa) pueda ser fácilmente intercambiable en función de la molécula a detectar o de la reacción a llevar a cabo)

20 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microchip que comprende:

A. un soporte que comprende un circuito impreso en su superficie formado por al menos una boca de entrada y al menos otra de salida comunicadas por un  
25 canal que a su vez contiene al menos un reservorio y

B. un material poroso funcionalizado incorporado dentro del circuito impreso y obtenido por la técnica de evaporación del disolvente sobre el mismo soporte, que comprende al menos un tipo de molécula activa inmovilizada en el interior  
30 de los poros mediante interacciones bien covalentes bien no covalentes, preferiblemente interacciones del tipo *host-guest* .

En la presente invención, se entiende como interacciones del tipo *host-guest* fuerzas entre moléculas o iones diferentes a los enlaces covalentes, tales como enlaces de  
35 hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas que ocurren de manera específica entre dos moléculas. Las interacciones *host-guest*

pueden formarse y romperse reversiblemente dependiendo de las condiciones del entorno, la presencia de otras moléculas con mayor afinidad o variando la concentración de la molécula huésped, entre otros factores.

5 En una realización preferida, la matriz del material poroso está formado a partir de poliestireno, poliacrilatos, policaprolactonas o poliácido láctico.

10 En otra realización preferida, los poros del material poroso contienen grupos inmovilizados obtenidos a través de la introducción de un aditivo (aditivo: copolimero de bloque o no que contiene los grupos funcionales deseados en su estructura) que se seleccionan de entre ciclodextrinas o sus derivados, grupos amino o sus derivados, grupos alcohol o sus derivados, o grupos ácido carboxílico o sus derivados. En una realización más preferida, los grupos inmovilizados son ciclodextrinas.

15 En otra realización preferida, la molécula activa inmovilizada en el interior de los poros se selecciona de entre enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas de adhesión, fluoróforos, cromóforos o moléculas sensoras. En una realización más preferida, la molécula inmovilizada es la enzima HRP.

20 En otra realización preferida, la molécula activa está modificada mediante la adición de un grupo químico, preferiblemente grupos adamantano que puede ser inmovilizada de manera selectiva y no covalente sobre superficies que contengan grupos ciclodextrina.

25 En una realización más preferida, la molécula activa es una enzima modificada con grupos adamantano. La modificación de enzimas y proteínas entre otros es delicada ya que su estructura secundaria puede verse afectada y por tanto su funcionalidad. En este caso la modificación con adamantano no interfieren en la estructura de la enzima guardando su actividad catalítica.

30 En otra realización preferida, el soporte es de vidrio, de silicio, o polimérico. Este soporte deber ser transparente para la detección mediante UV-vis o fluorescencia y/o conductor para evaluación de la capacidad sensora mediante métodos electroquímicos.

35

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del microchip según se ha descrito anteriormente para la detección de sustancias, para llevar a cabo reacciones (por ejemplo electroquímicas) o para catálisis enzimática.

5 En la mayoría de los ensayos la detección se hace bien visualmente, bien mediante espectroscopia UV o fluorescencia. Otra posibilidad es tener un polímero matriz conductor y el soporte también de manera que la detección se podría hacer, por ejemplo, mediante métodos electroquímicos.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un sensor que comprende el microchip según se ha descrito anteriormente.

Para la obtención de los microchips de la presente invención, la técnica de evaporación de los disolventes de puede llevar a cabo de dos formas:

- 15 i. introduciendo el microchip dentro de una cámara húmeda y depositando la disolución a evaporar dentro de los pozos del chip. Así una vez que se evapore el disolvente el chip tendrá los pozos con poros funcionalizados, o
- ii. utilizando un dispositivo cerrado que se rellena con la disolución. Después de introducir aire húmedo dentro del dispositivo que vacía los canales pero deja  
20 llenos de disolución los reservorios. Este aire se deja pasar durante el proceso de evaporación de tal manera que al final también se forman poros en las cavidades.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de  
25 un microchip según se ha descrito anteriormente que comprende al menos las siguientes etapas:

- a) obtener una disolución de los precursores del material poroso en al menos un disolvente orgánico volátil,
- b) depositar la disolución de la etapa anterior en el canal del circuito impreso  
30 del soporte,
- c) hacer pasar sobre la superficie del canal un flujo de aire con una humedad relativa superior al 90%, o dejarlo evaporar en una atmósfera saturada en vapor de agua, y
- d) añadir la molécula activa sobre el material poroso obtenido en la etapa  
35 anterior.

En una realización preferida, el disolvente orgánico volátil utilizado en la etapa (a) se selecciona de entre THF, CS<sub>2</sub>, acetona, CHCl<sub>3</sub> y cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el disolvente orgánico volátil utilizado en la etapa (a) se selecciona de entre THF, CHCl<sub>3</sub> y cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente aún el disolvente comprende THF y CHCl<sub>3</sub>, obteniéndose con dicha mezcla una superficie con una distribución de poros más homogénea.

En otra realización preferida, los precursores del material poroso de la etapa (a) son monómeros de estireno sin modificar o modificados, monómeros de acrilato sin modificar o modificados o mezclas de los mismos. En una realización más preferida, los precursores del material poroso son monómeros de estireno modificados con ciclodextrina.

En otra realización preferida, la molécula activa se selecciona de entre enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas de adhesión, fluoróforos, cromóforos o moléculas sensoras.

En otra realización preferida, la molécula activa está modificada mediante la adición de un grupo químico.

En una realización más preferida, la molécula activa es una enzima modificada con grupos adamantano.

Las ventajas de la invención respecto a otras estrategias conocidas es que se pueden inmovilizar otro tipo de moléculas: secuencias de reconocimiento de proteínas, o de adhesión celular por ejemplo. La inmovilización puede ser covalente o no-covalente. En este último caso se puede recuperar el sustrato original y volverlo a reutilizar. En el primero se gana en estabilidad y en durabilidad del dispositivo. Ambos se pueden hacer mediante la técnica de evaporación del disolvente de la invención.

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.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1** Esquema de funcionamiento de un equipo de estereolitografía.

5

**FIG. 2** a) Esquema de la estructura del dispositivo empleado para la funcionalización del dispositivo mediante flujo controlado; b) Vista en sección del montaje del dispositivo.

10

**FIG. 3** a) Cámara hermética de trabajo. b) Imágenes obtenidas en SEM de las estructuras porosas obtenidas para una mezcla de PS y PS-b-PDMAEMA.

**FIG. 4.** Esquema del método de formación de estructuras porosas en los reservorios del chip.

15

**FIG. 5.** a) Esquema de la oxidación de ABTS por interacción con HRP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. b) control de la reacción. c) color verde observado como resultado de la oxidación de ABTS. d) actividad de HRP soluble, HRP-Ada y su control.

20

**FIG. 6.** Inmovilización de a) HRP sin modificar sobre la superficie de HPS + P (S-co-SCD); b) HRP-Ada sobre la superficie de HPS y c) HRP-Ada sobre la superficie de HPS + P (S-co-SCD). En todos los casos la enzima se incubó durante 60 minutos con una concentración de 0,01 mg / ml en tampón PB 40 mM pH 6,8. d) Variación de la absorbancia a 405 nm durante la oxidación catalítica de ABTS utilizando sustratos a) -c). e) Actividad de los diferentes sustratos.

25

**FIG. 7.** a) Evolución de la absorbancia medida durante los tres primeros ciclos catalíticos; b) Actividad enzimática medida durante 5 ciclos consecutivos evidenciando una actividad constante de las superficies.

30

**FIG. 8.** a) Evolución de la absorbancia a 405nm para superficies de control, superficies con HRP en el primer ciclo y al retirar de la superficie usando  $\beta$ -CD en disolución. b) Actividad catalítica de las superficies exploradas en a).



## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

5

### 1. Diseño del soporte con el circuito impreso: modelado tridimensional e impresión en 3D.

Los modelos 3D virtuales a partir de los cuales se imprimieron las piezas del microchip de la invención fueron generados con un software de diseño asistido por ordenador o CAD (siglas de *computer aided design*). Este formato divide el modelo virtual en sucesivas capas bidimensionales transversales en función de la resolución de la impresora. Finalmente la impresora genera el volumen por la adición de material en cada una de estas capas. La impresora utilizada fue un equipo de escritorio con tecnología MicroSLA (estereolitografía). Imprime un volumen máximo de 43x27x150mm por capas de 30 µm con una resolución en el plano X-Y de 165 µm. La estereolitografía es una tecnología de manufactura aditiva que consigue generar volúmenes solidificando capa a capa resinas fotopolimerizables tras la irradiación de estas con luz UV. En este proceso, la pieza es impresa sobre una plataforma horizontal, sumergida en dicha resina. Gracias a unos espejos de gran precisión es posible focalizar el haz del láser sobre la superficie de la resina, de manera que el material irradiado solidifica sobre la plataforma de impresión, creándose capas cuyo espesor depende de la resolución de la impresora, oscilando generalmente entre 0.015 y 0.15 mm (Fig. 1). Una vez irradiada una capa, la plataforma de impresión se desplazó para permitir la solidificación de una nueva capa de material sobre las ya generadas. Este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener el volumen final. Una vez impresas, las piezas se sumergieron en etanol para retirar el exceso de resina con el que salen de la impresora y posteriormente se sometieron a un proceso de post-curado (irradiación de la pieza con luz UV) para completar la fotopolimerización.

30

### 2. Incorporación del material poroso al microchip

Para la obtención de microchips funcionales, una vez obtenido el soporte por impresión 3D, se procedió a incorporar el material poroso a este soporte. Como se muestra esquemáticamente en la Fig. 2, la pieza impresa contará con una boca de entrada y otra de salida, comunicadas por un canal a través del que se hace circular

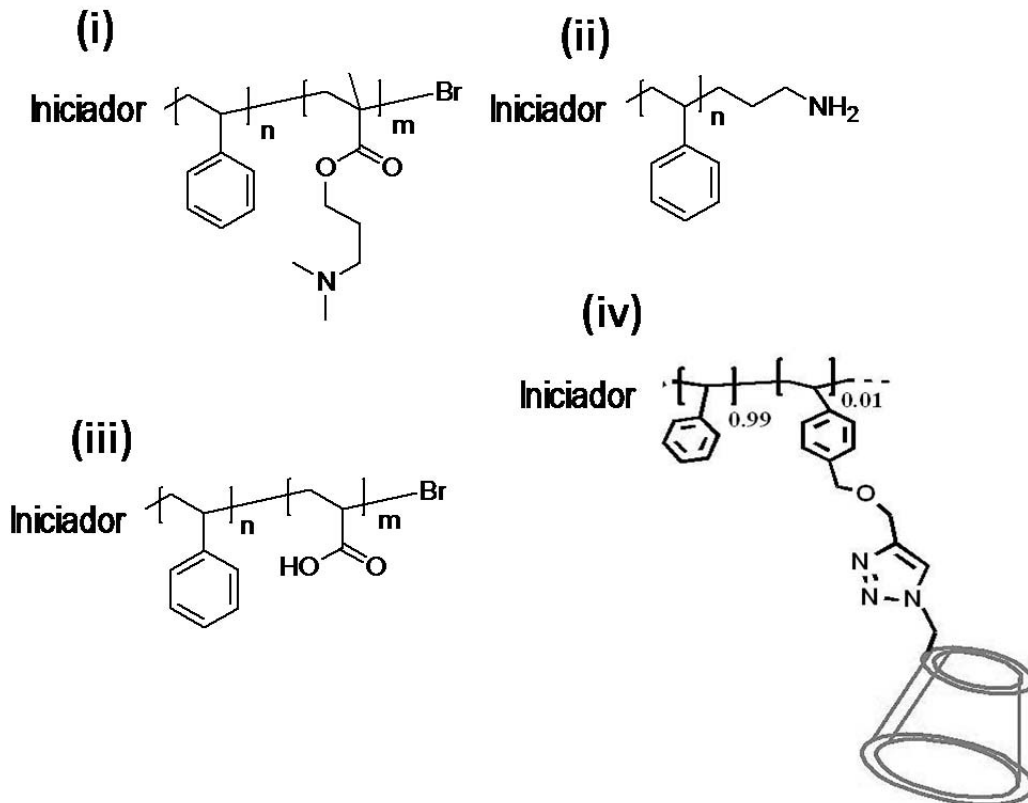
35

un fluido. A lo largo del canal se situaron reservorios de distinto tamaño, forma y número donde se introdujeron tanto los hidrogeles como los materiales porosos. Así, una vez fabricado el dispositivo, el líquido de interés circulará a través de este y entrará en contacto con el material previamente encapsulado en los reservorios del dispositivo.

5

Para obtener el material poroso se emplearon cuatro polímeros diferentes para estudiar tanto su inmovilización en el chip como la formación de poro en los pocillos de las piezas impresas. La estructura de los polímeros utilizados es la siguiente:

10



(i) Poliestireno-b-poli(N,N'-dimetilaminoetil metacrilato) (PS-b-PDMAEMA), (ii) poliestireno-mono amino funcionalizado (PS-NH<sub>2</sub>), (iii) poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) y (iv) copolimero estadístico de poliestireno y poliestireno modificado con β-ciclodextrina (β-CD).

15

Estos polímeros fueron sintetizados previamente. Para la formación de las estructuras porosas cada uno de estos polímeros fue mezclado con poliestireno (PS) de alto peso molecular (250 kDa) en una proporción de 20 a 80 en peso, es decir, con PS como componente mayoritario y disuelto en cloroformo con una concentración en polímero de 30mg/ml. Los sistemas propuestos permitirán formar estructuras porosas con un interior de poro distinto químicamente al exterior del poro. Los grupos funcionales tenderán a formar parte del interior del poro dando lugar a estructuras que tiene grupos dimetilamino, aminas primarias, grupos ácido o ciclodextrinas respectivamente.

Para la deposición de los materiales previamente citados en los chips impresos se han utilizado dos métodos:

a) Deposición directa en los reservorios.

La primera serie de experimentos se llevó a cabo mediante la inyección de manera manual de los distintos componentes dentro del dispositivo. Para ello se utilizó una micropipeta con la que se puede depositar una cantidad exacta en cada reservorio de manera manual dentro de una cámara con una humedad relativa controlada. El caso concreto de la deposición de disoluciones para la formación de estructuras superficiales porosas debe realizarse en unas condiciones de humedad relativa superiores al 90%. Para conseguir estas condiciones de trabajo se utilizó una cámara hermética que ha permitido conseguir y mantener esta condición de humedad. Las deposiciones fueron efectuadas sobre piezas impresas con tres reservorios de 4mm de diámetro y 0,25mm de profundidad. Sobre cada reservorio se han depositado 7  $\mu$ L de las diferentes disoluciones de polímeros-PS. Las siguientes imágenes obtenidas por SEM muestran la formación de películas porosas dentro de los reservorios (Fig. 3).

b) Formación de los poros en el dispositivo mediante flujo controlado de los componentes.

El segundo método para formar estructuras porosas dentro del dispositivo consistió en la inyección de los distintos precursores utilizando una bomba peristáltica de precisión (Fig. 4). El dispositivo está compuesto por el microchip que será cubierto con una tapa para hacerlo estanco (típicamente una lámina de silicona transparente). El chip contiene una entrada y una salida con un número determinado de reservorios (en este caso se varió entre 2 y 4) con diámetros (entre 200 micras y 2mm) y profundidades variables (desde 100 micras hasta 3mm). Los reservorios, más profundos que el canal

que los une, permitirán formar estructuras porosas funcionalizadas. El proceso se hace en dos etapas. En la primera se hace circular por el circuito la disolución que contiene la mezcla de polímeros. En la segunda etapa se hace pasar aire húmedo que limpia los canales de disolución y permite que el proceso de formación de poros se haga en los reservorios que, estos si, quedan llenos de la disolución.

### 3. Funcionalización de las superficies porosas

a) Inmovilización de biomoléculas y/o moléculas sensoras.

Los chips de la invención aquí descritos han sido preparados con el precursor monomérico (i) mencionado anteriormente con poros que contienen grupos poli(dimetilamino etilmetacrilato). Estos grupos funcionales son capaces, por ejemplo, de formar complejos coloreados cuando reaccionan con grupos nitro (contenidos por ejemplo en trinitrotolueno (TNT) mediante la reacción de Meisenheimer).

15

b) Inmovilización de la enzima dentro de los poros.

Antes de la etapa de inmovilización, la enzima se modificó en primer lugar parcialmente con grupos adamantano (Ada) siguiendo procedimientos previamente descritos. La estrategia implica la reacción entre los grupos amina de aminoácidos de lisina presentes en la superficie de la enzima y grupos de ácido carboxílico de una molécula de adamantano modificada. Esta estrategia permite funcionalizar la enzima mientras se mantiene la estructura secundaria y su actividad catalítica. Posteriormente, las películas se sumergieron en 0,32 ml de una solución de HRP-Ada (0,01 mg / ml) a 40 mM pH 6,8 de fosfato de potasio durante 4 h. En momentos diferentes, la solución sobrenadante se midió a 595 nm con el ensayo de Proteína (Bio Rad) reactivo para determinar la concentración de proteína no adsorbida. Las películas se enjuagaron entonces con agua, fosfato de potasio 40 mM pH 6,8 y fosfato potásico de 40 mM con albúmina de suero bovino al 0,25% (p / v) y Triton X-100 al 0,5% (v / v) a 25°. Como control, los experimentos en blanco se llevaron a cabo utilizando superficies HPS sin restos  $\beta$ -CD y enzima HRP no modificada (0,01 mg / ml) para evaluar la presencia de interacciones no específicas.

### 4. Actividad enzimática dentro del microchip

Para determinar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada se procedió a estudiar la reacción en la que interviene la HRP. Esta enzima se une a  $H_2O_2$  formando

un complejo capaz de oxidar diferentes compuestos. En este caso, se empleó azido-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato modelo. Este compuesto, en su forma oxidada, presenta un color verde azulado, que se puede detectar fácilmente midiendo UV-Vis a una longitud de onda fija de  $\lambda = 405$  nm. Para probar el efecto de la modificación de la enzima con Ada, se exploró la actividad catalítica en solución de la enzima no modificada (HRP), la enzima que porta restos de adamantano (HRP-Ada) y un experimento de control sin  $H_2O_2$  (Control). Los experimentos (mostrados en la Figura 5) revelaron que la actividad en solución de la HRP tras la modificación con adamantano disminuyó manteniendo, sin embargo, alrededor del 50% de la actividad inicial.

Con el fin de comprender la cinética de las superficies modificadas, se midió la evolución de la absorbancia en momentos diferentes para las muestras representadas en la Figura 6. En la Figura 6d se representa la evolución de la absorbancia en función del tiempo de reacción. Un notable y lineal aumento en la absorbancia sólo se obtuvo en el caso de Ada modificado HRP en P (S-co-SCD) superficies. Como se observa en la figura, sólo en este caso el depósito donde se produce la catálisis se convierte en color verde después de 1 h de incubación. En el resto de los casos se puede observar una actividad catalítica casi despreciable. Esta actividad catalítica residual puede atribuirse a la hidrólisis química del sustrato que, como se esperaba, puede ser despreciada cuando se compara con la hidrólisis enzimática en el caso en que ocurre la interacción huésped-huésped. La actividad del HRP-Ada soportado fue  $\sim 33$  U / mg (Figura 6e).

## 25 5. Estabilidad de la inmovilización enzimática y evaluación de la recuperación.

Una vez demostrada la especificidad de la interacción *host-guest* para inmovilizar sólo las enzimas que llevan grupos Ada, se exploró la estabilidad de estas interacciones y la actividad enzimática durante los ciclos repetitivos. El uso de interacciones *host-guest* permite la recuperación enzimática utilizando las condiciones apropiadas indicadas a continuación.

Para determinar si las superficies y en particular las interacciones *host-guest* son lo suficientemente fuertes para llevar a cabo varios ciclos de reacción, se llevó a cabo el mismo ensayo catalítico sobre una misma superficie durante cinco ciclos. Posteriormente a cada ciclo, la superficie se lavó a fondo con tampón PB. Como

puede verse en la figura 7a, las superficies presentan actividad catalítica durante los ciclos explorados (hasta cinco). De forma más interesante, la velocidad catalítica observada se estabiliza durante los ciclos y exhibe una actividad enzimática media de  $28 \pm 5$  U / mg.

5

En vista del uso potencial de estas superficies catalíticas con otras enzimas y aprovechando las interacciones *host-guest* para reutilizar estas superficies funcionales porosas, se evaluó la posibilidad de recuperar la enzima HRP-Ada inmovilizada. Para este propósito, se intentó un desplazamiento de la HRP-Ada inmovilizada desde la superficie mediante un exceso de  $\beta$ -CD libre. Se sumergieron las superficies que

10

contenían HRP-Ada en una solución acuosa de 6,0 mg / ml de  $\beta$ -CD en tampón fosfato pH = 6,8 con Triton X100 al 0,2% y 3 mg / ml de albúmina durante 2 h a 25°C. El sobrenadante se retiró y después se lavaron las superficies varias veces. Posteriormente, se repitió el ensayo catalítico utilizando las mismas condiciones.

15

Como se representa en la Figura 8a, no se pudo observar actividad catalítica en las superficies expuestas a  $\beta$ -CD. Por lo tanto, se puede concluir que la liberación de la HRP-Ada desde el sustrato se ha logrado con éxito (Figura 8b). Además, se puede estimar, teniendo en cuenta la actividad de la enzima liberada, que aproximadamente 1-3  $\mu$ g de enzima HRP fueron adsorbidos en alrededor de 1 cm<sup>2</sup>.

20

## REIVINDICACIONES

1. Microchip que comprende:
  - 5 A. un soporte que comprende un circuito impreso en su superficie formado por al menos una boca de entrada y al menos otra de salida comunicadas por un canal que a su vez contiene al menos un reservorio y
  - 10 B. un material poroso funcionalizado incorporado dentro del circuito impreso y obtenido por la técnica de evaporación del disolvente sobre el mismo soporte, que comprende al menos un tipo de molécula activa inmovilizada en el interior de los poros mediante interacciones covalentes o no covalentes del tipo *host-guest*.
2. Microchip según la reivindicación 1, donde las interacciones de tipo *host-guest* no-covalentes son de enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der  
15 Waals o interacciones hidrofóbicas.
3. Microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la matriz del material poroso está formado a partir de poliestireno, poliacrilatos, policaprolactonas o poliácido láctico.  
20
4. Microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde los poros del material poroso contienen grupos inmovilizados que se seleccionan de entre ciclodextrinas o sus derivados, grupos alcohol o sus derivados, grupos amino o sus derivados, o grupos ácido carboxílico o sus derivados.  
25
5. Microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la molécula activa inmovilizada en el interior de los poros se selecciona de entre enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas de adhesión, fluoróforos, cromóforos o moléculas sensoras.  
30
6. Microchip según la reivindicación anterior donde la molécula activa está modificada mediante la adición de un grupo químico.
7. Microchip según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 donde la molécula activa  
35 es una enzima modificada con grupos adamantano.

8. Microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el soporte es de vidrio, de silicio o polimérico.
- 5 9. Uso del microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la detección de sustancias o para catálisis enzimática.
10. Sensor que comprende el microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 11. Procedimiento de obtención de un microchip según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende al menos las siguientes etapas:
- a) obtener una disolución de los precursores del material poroso en al menos un disolvente orgánico volátil,
  - 15 b) depositar la disolución de la etapa anterior en el canal del circuito impreso del soporte,
  - c) hacer pasar sobre la superficie del canal un flujo de aire con una humedad relativa superior al 90%, y
  - d) añadir la molécula activa sobre el material poroso obtenido en la etapa anterior.
- 20 12. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el disolvente orgánico volátil se selecciona de entre THF,  $\text{CHCl}_3$  y cualquiera de sus combinaciones.
- 25 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 donde los precursores del material poroso son monómeros de estireno sin modificar o modificados, monómeros de acrilato sin modificar o modificados o mezclas de los mismos.
- 30 14. Procedimiento según la reivindicación anterior donde los monómeros de estireno están modificados con ciclodextrina.
- 35 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 donde la molécula activa se selecciona de entre enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas de adhesión, fluoróforos, cromóforos o moléculas sensoras.



16. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la molécula activa está modificada mediante la adición de un grupo químico.
  17. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la molécula activa es una enzima modificada con grupos adamantano.
- 5

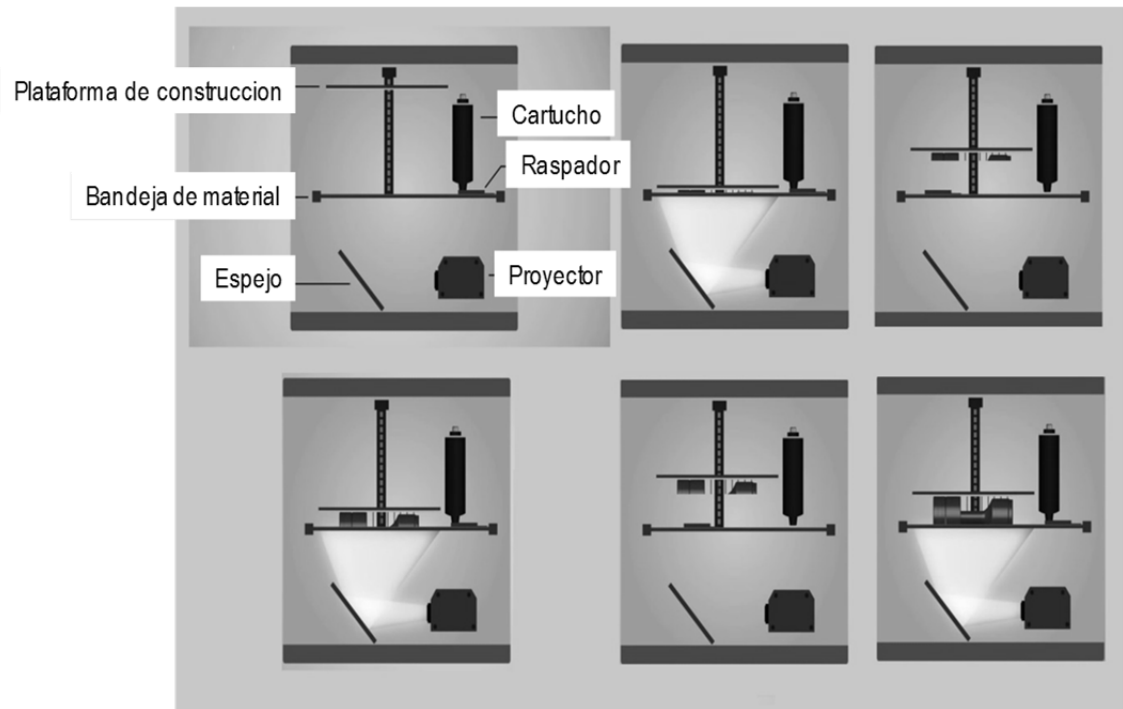


FIG. 1

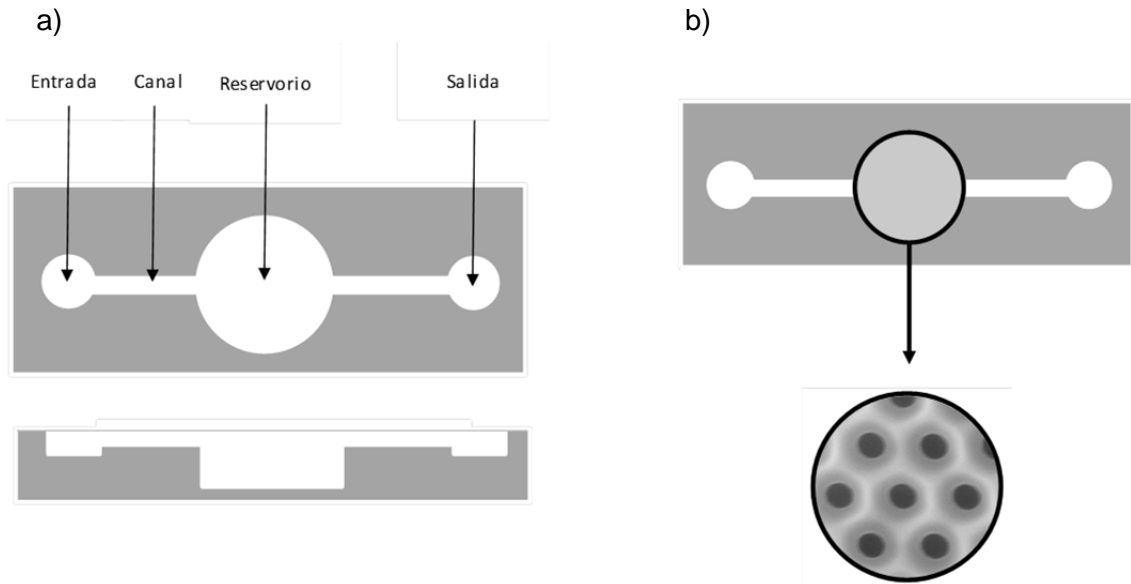


FIG. 2

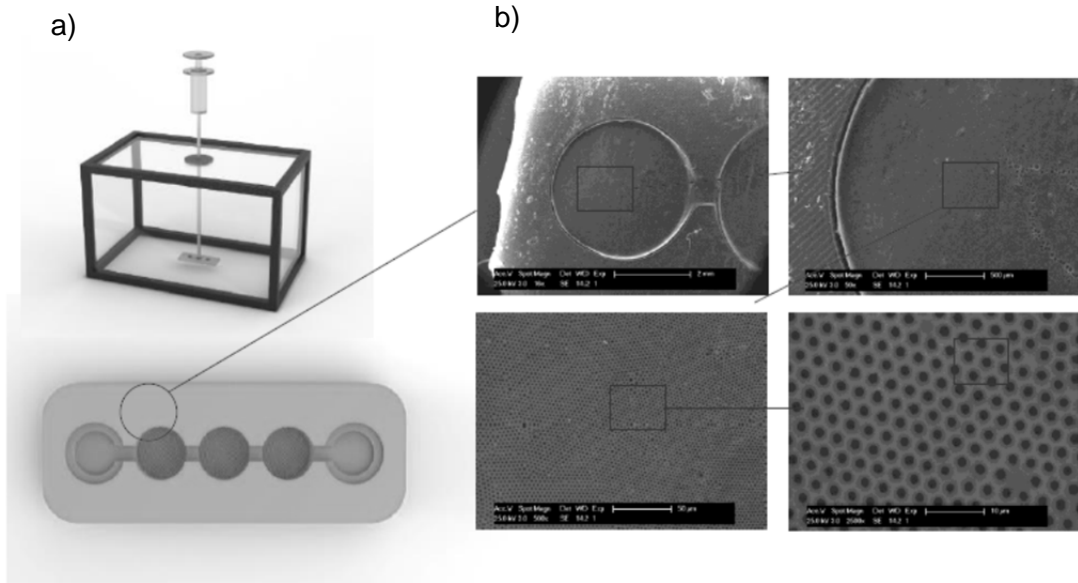


FIG. 3

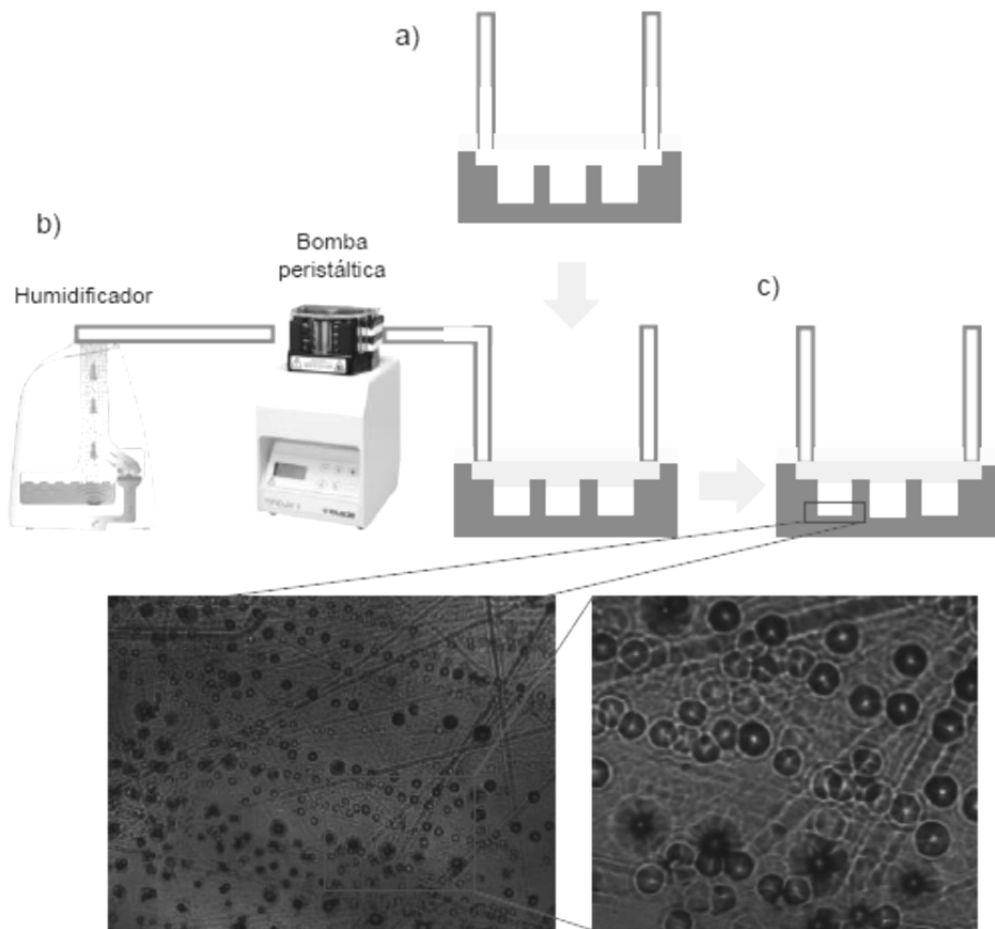


FIG. 4

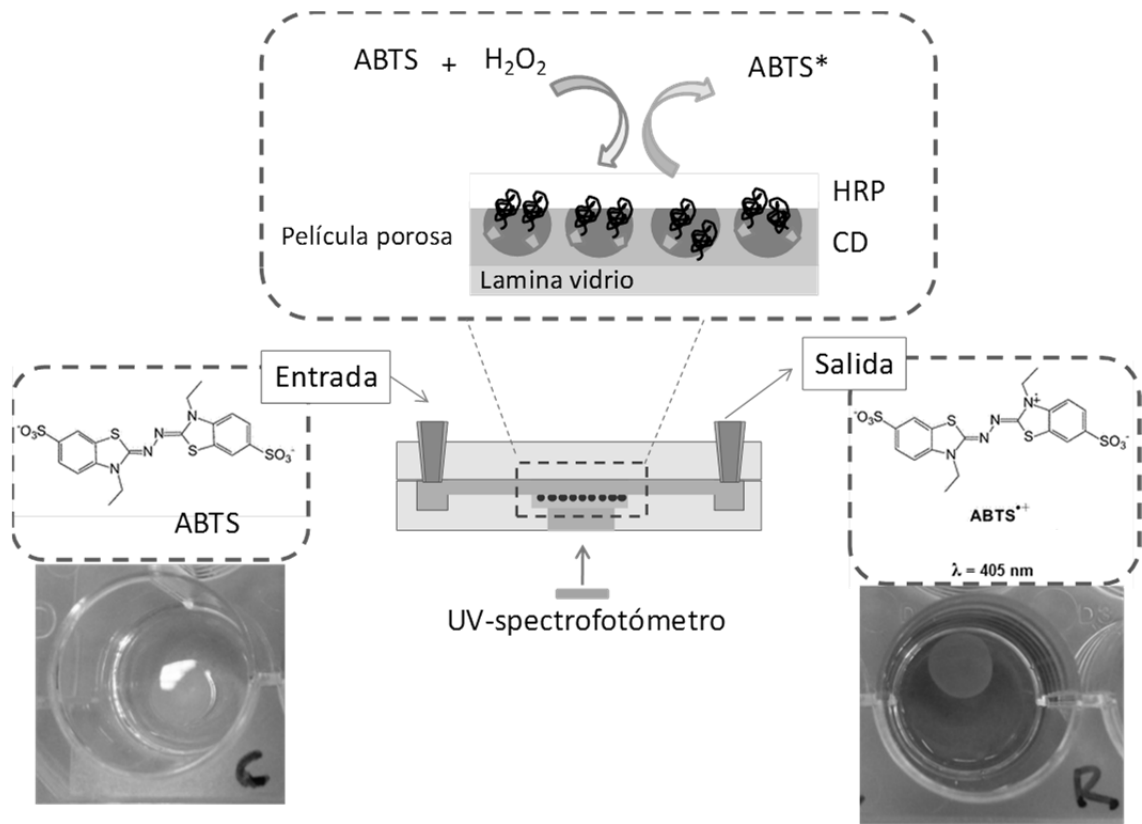


FIG. 5

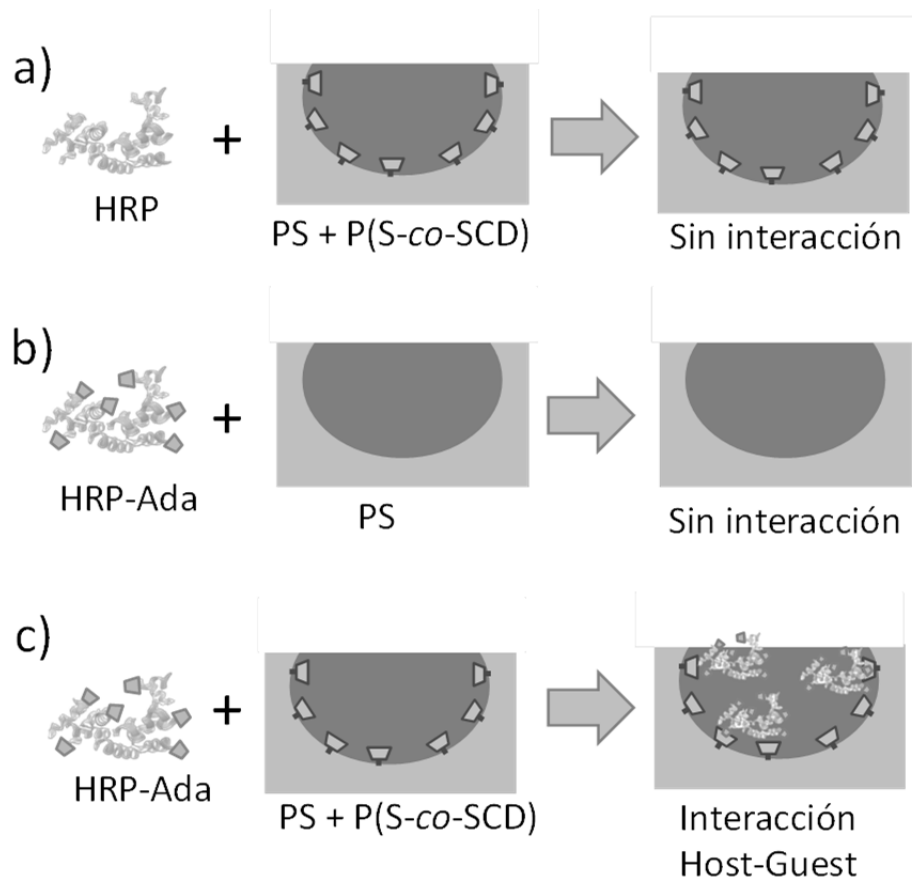


FIG. 6

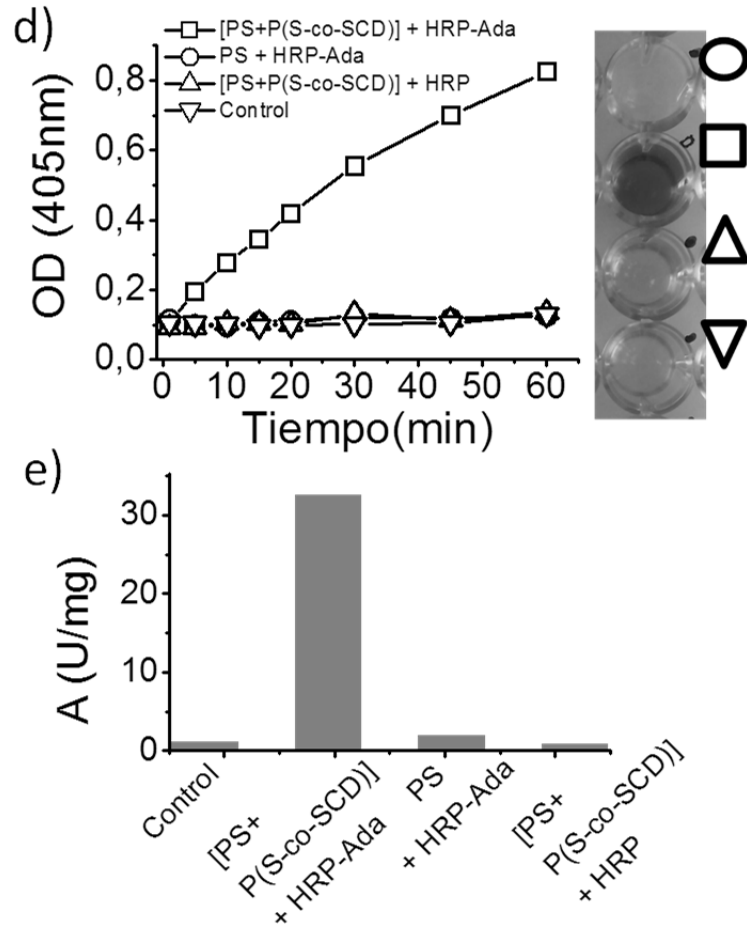


FIG. 6 (CONT.)

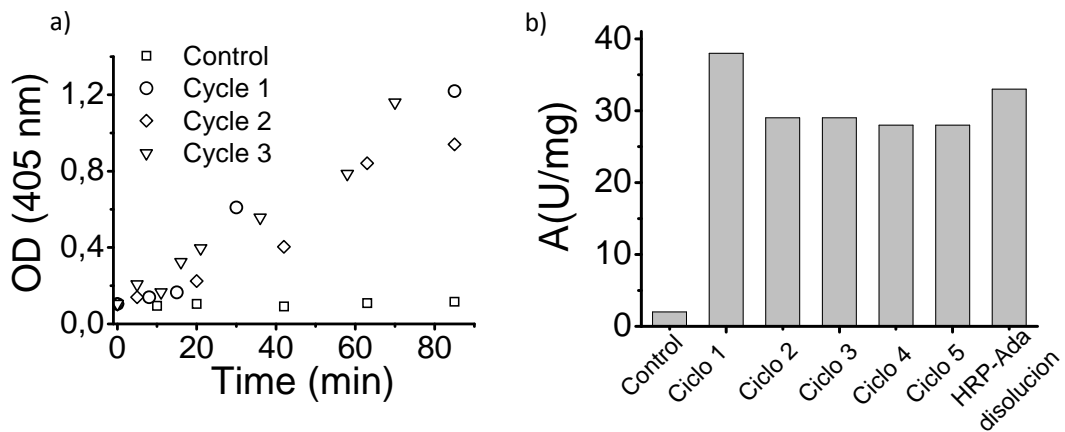


FIG. 7

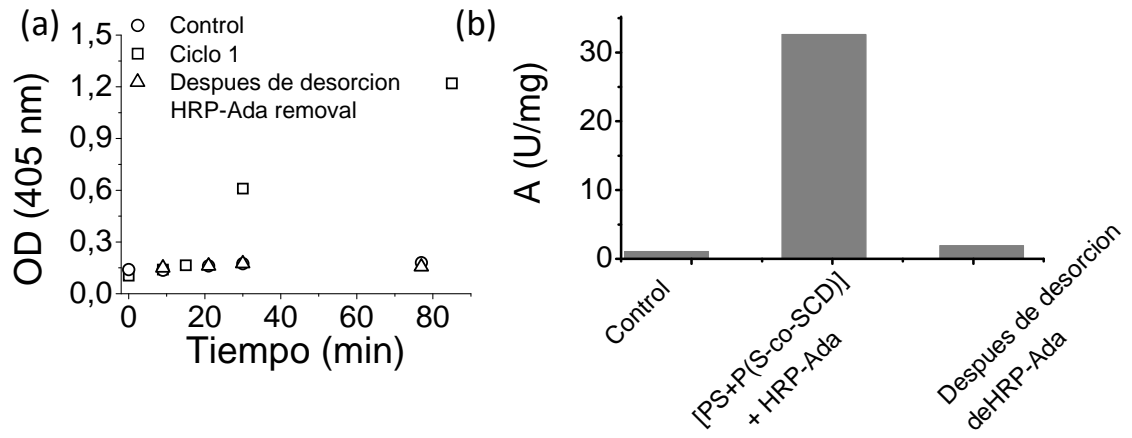


FIG. 8