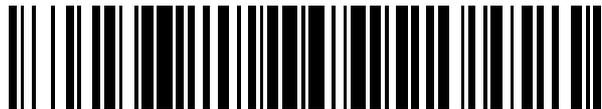


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 830**

51 Int. Cl.:

C09D 5/44 (2006.01)

C25D 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2003 PCT/FR2003/001814**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2004 WO04005410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2003 E 03762703 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 1551928**

54 Título: **Soporte sólido que incluye una superficie conductora o semiconductor de la electricidad funcionalizada, su procedimiento de fabricación y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

04.07.2002 FR 0208381

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.02.2019

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**BUREAU, CHRISTOPHE;
MOUANDA, BRIGITTE;
AMEUR, SAMI;
CHARLIER, JULIENNE y
PALACIN, SERGE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 699 830 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Soporte sólido que incluye una superficie conductora o semiconductora de la electricidad funcionalizada, su procedimiento de fabricación y sus utilizaciones

5 La presente invención está referida a un soporte sólido funcionalizado que incluye una superficie conductora o semiconductora de la electricidad recubierta con una capa orgánica electroinjetada funcionalizada en el seno de la cual al menos el 90 % del número de grupos funcionales es accesible, al procedimiento de preparación de tal soporte, así como a sus utilizaciones, especialmente en calidad de recubrimiento de adhesión para la fijación de moléculas de interés o de objetos portadores de una función complementaria ("velcro® molecular").

10 La funcionalización de una superficie es la operación mediante la cual se consigue fijar una molécula de interés (por ejemplo, una molécula que tiene unas propiedades probadas en disolución) sobre una superficie, a fin de que –al menos– conserve en ella la totalidad o parte de sus propiedades. Por lo tanto, la funcionalización de una superficie implica que se dispone de la molécula de interés y de un procedimiento asociado para fijarla sobre la superficie.

15 Siendo la mayoría de las veces la molécula de interés una molécula orgánica (u órgano-metálica), el procedimiento consiste, la mayoría de las veces, en sacar provecho de la amplísima biblioteca de reacciones de la química orgánica: el razonamiento no es otro que el de poder hallar grupos funcionales que, respectivamente sobre la superficie y sobre la molécula de interés, sean compatibles, es decir, que puedan reaccionar entre sí fácilmente –y, de ser posible, rápidamente–.

20 Cuando se dispone, por ejemplo, de una superficie que posee grupos hidroxilo o amino, se puede funcionalizarla dotando la molécula de interés, por ejemplo, de grupos isocianato o siloxano tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP-A-1110946, en la solicitud internacional WO 00/51732 o en la patente US 6.258.454, o bien aún de cloruros de ácido tal como está descrito en la solicitud de patente FR-A-2781232.

25 Cuando la molécula de interés no dispone de grupos funcionales directamente compatibles con los de la superficie, se puede prefuncionalizar esta superficie con una molécula orgánica intermedia bifuncional, uno de cuyos grupos funcionales es compatible con los de la superficie, y el otro, con los de la molécula que se quiere fijar. En ocasiones se dice que la molécula es un recubrimiento de adhesión (véase, por ejemplo: E.P. Plueddmann, in "Fundamentals of Adhesion", L.H. Lee (Ed.), p. 279, Plenum Press, New-York (1990)).

30 De acuerdo con la presente invención, la fijación de este recubrimiento de adhesión es lo que nos interesa considerar como molécula de interés: se presta interés, en esta memoria, a la manera de fijar un primer fragmento orgánico sobre una superficie, en particular cuando esta es mineral, considerándose las etapas siguientes de posfuncionalización como reacciones orgánicas puras.

35 Desde este punto de vista, se observa que la funcionalización de una superficie no es sino un caso particular de reacciones de la química orgánica donde uno de los dos reactivos es una superficie, más que una molécula en disolución. Ciertamente es que la cinética asociada a las reacciones heterogéneas entre una disolución y una superficie es sensiblemente diferente de la reacción análoga en fase homogénea, pero los mecanismos son –en su fundamento– idénticos.

En ciertos casos, se activa la superficie pretratándola al objeto de crear en ella grupos funcionales que tengan una reactividad superior, al objeto de obtener una reacción más rápida. Puede tratarse especialmente de grupos funcionales inestables, formados de manera transitoria, como por ejemplo radicales formados por oxidación brusca de la superficie, ya sea por vía química, o bien por vía de irradiación:

- 40
- se puede funcionalizar una superficie portadora de grupos nitrogenados bombardeándola con partículas (iones, electrones, protones...) al objeto de transformar estos grupos nitrogenados en nitrenos, que pueden reaccionar con un gran número de grupos funcionales orgánicos tal y como ya se ha descrito en la solicitud internacional WO 98/22542 así como en la patente US 6.022.597;
 - 45 - se puede funcionalizar una superficie haciendo que experimente un tratamiento por plasma, en el que el gas de plasma contiene un monómero susceptible de reaccionar con los grupos reactivos formados en la irradiación tal y como ya se ha descrito en la patente US 6.287.687 y en la solicitud internacional WO 01/34313;
 - se puede funcionalizar una superficie hidroxilada oxidándola fuertemente mediante sales metálicas, al objeto de fabricar en ella radicales susceptibles de iniciar reacciones de polimerización orgánica tal y como ya se ha descrito, por ejemplo, en las patentes US 4.421.569, US 5.043.226 y US 5.785.791;
 - 50 - se puede funcionalizar una superficie por mediación de radicales, ya sea por irradiación con iones pesados como se describe, por ejemplo, en la patente US 6.306.975, ya sea por vía térmica como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 98/49206, o bien aún por vía fotoquímica como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 99/16907, etc.

En todos estos ejemplos, cuya lista no es exhaustiva, se modifica, por tanto, bien la superficie, o bien la molécula de interés, al objeto de que –una vez modificada(s)– el anclaje entre las dos entidades se reduzca a una reacción conocida por lo demás en el catálogo de las reacciones de la química orgánica.

5 Ahora bien, se observa que este razonamiento tan solo es posible en tanto la superficie tenga una estructura electrónica análoga a la de un aislante: en el lenguaje de los físicos, puede decirse que es necesario que la superficie posea estados localizados. En el de los químicos, que posea grupos funcionales.

10 Cuando la superficie es un conductor o un semiconductor no o escasamente dopado, no existen tales estados localizados: los estados electrónicos de la superficie son estados deslocalizados. Dicho de otro modo, la noción de "grupo funcional" (en la línea de la química orgánica) no tiene sentido, y es imposible utilizar el catálogo de las reacciones de la química orgánica para fijar una molécula de interés sobre una superficie.

Existen dos excepciones notorias: son las reacciones químicas espontáneas de las funciones tiol ($-SH$, véase especialmente: Z. Mekhalif *et al.*, Langmuir, 1997, 13, 2285) y de los isonitrilos ($-N=C$, véase, por ejemplo: V. Huc *et al.*, J. of Physical Chemistry B, 1999, 103, 10489) sobre las superficies metálicas y, en especial, sobre las superficies de oro.

15 Ahora bien, estas reacciones no son aprovechables en todas las situaciones. En efecto, los tioles, por ejemplo, dan lugar a enlaces azufre/metal frágiles. Estos enlaces se rompen, por ejemplo, cuando el metal se polariza con posterioridad catódicamente o anódicamente, para formar respectivamente tiolatos y sulfonatos, que se desorben.

Dejando aparte estos dos ejemplos aislados, no existen reacciones químicas simples que permitan funcionalizar superficies conductoras o semiconductoras de la electricidad.

20 El medio más empleado para realizar la fijación de moléculas orgánicas sobre superficies conductoras o semiconductoras de la electricidad es sortear la dificultad citándose a un problema conocido. Se trata de formar sobre estas superficies, previamente, grupos hidroxilo, asegurando la promoción de una capa de óxido (total o parcialmente hidratada) sobre el metal. Sobre el grafito, sin embargo, que no posee óxidos sólidos, la anodización produce grupos hidroxilo que son aprovechables (en él se pueden fabricar asimismo, en ciertas condiciones, grupos carboxilo). Cuando se ha podido formar sobre la superficie grupos hidroxilo, esto nos vuelve a situar ante una superficie que posee estados electrónicos de superficie localizados, es decir, grupos funcionales, y nos vuelve a situar ante un problema conocido. En particular, cabe entonces la posibilidad de aplicar todos los procedimientos de funcionalización que se han relacionado antes para las superficies de aislantes.

30 Sin embargo, además de que es imposible formar una capa de óxido sobre el oro, así como sobre numerosos metales nobles, se delega a la capa de óxido y a su modo de obtención gran parte de la responsabilidad en la solidez de la interfase que se fabricará entre la molécula orgánica de interés y la superficie metálica (ahora bien, ciertos óxidos, en particular cuando son no estequiométricos, no son cubrientes, e incluso no adherentes). Además, esta vía precisa de al menos dos o tres etapas para conseguir la fijación de una molécula de interés, puesto que, primero, hay que construir la capa de óxido antes de anclar la propia molécula de interés (dos etapas), o bien antes de anclar un recubrimiento de adhesión que permitirá el anclaje de la molécula de interés (tres etapas).

35 Cabe asimismo la posibilidad de fijar fragmentos orgánicos sobre superficies conductoras y semiconductoras por vía electroquímica.

40 El procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 98/44172 permite efectivamente fijar grupos funcionales orgánicos sobre superficies conductoras. Se trata de un procedimiento mediante el cual una superficie conductora se pone a potencial (catódico) en una disolución que contiene sales de aril diazonio, funcionalizadas con el grupo funcional que se quiere fijar sobre la superficie. Ahora bien, las sales de aril diazonio se fabrican a partir de una amina aromática, merced a una reacción de diazoación que utiliza nitrato de sodio en medio clorhídrico. Esta etapa precisa de un pH muy bajo, por lo que no es compatible con todos los grupos funcionales que se desee fijar. Sabido es que, por ejemplo, es imposible diazoar una amina aromática portadora de un grupo succinimida (útil para fijar una molécula de interés portadora de grupos hidróxido o amino), de un grupo amino o bien también de un grupo piridina, y que los grupos funcionales diazonio difícilmente son compatibles con los enlaces insaturados, cuya polimerización pueden estos provocar fácilmente por vía radical.

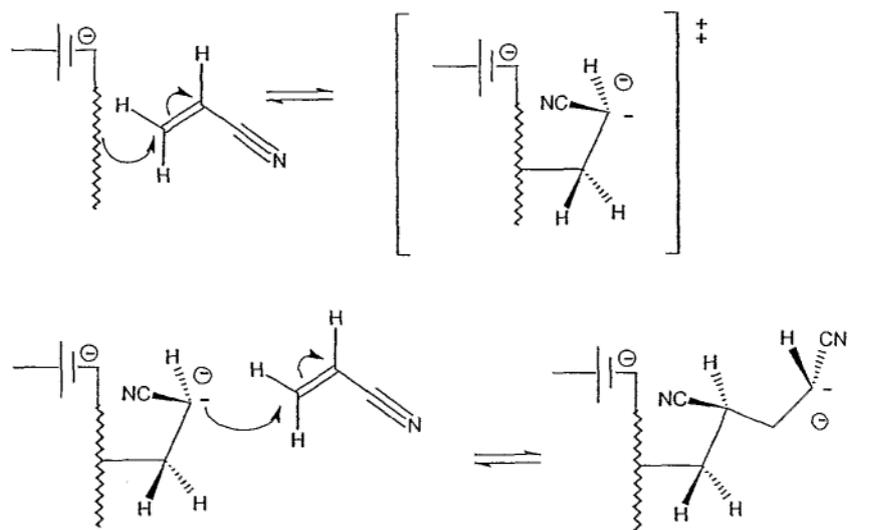
50 En ciertos casos, cuando ningún grupo funcional es compatible a la vez con los de la molécula de interés y con la reacción de diazoación, la utilización del procedimiento de injerto de las sales de diazonio precisa pasar por una etapa intermedia en cuyo transcurso la capa electroinjetada se funcionaliza con un recubrimiento de adhesión bifuncional, uno al menos de cuyos grupos es compatible con los grupos funcionales de la molécula de interés.

55 Además, este procedimiento no permite –en la práctica– realizar capas gruesas, lo que conduce a un número relativamente escaso de grupos funcionales injertados, y muy próximos a la superficie. Los grupos funcionales que han sido injertados son en su conjunto moderadamente accesibles para reacciones de funcionalización ulterior con una molécula orgánica. La consecuencia más directa a efectos prácticos de esta observación es que las reacciones de posfuncionalización sobre las superficies conductoras recubiertas con una capa orgánica según este

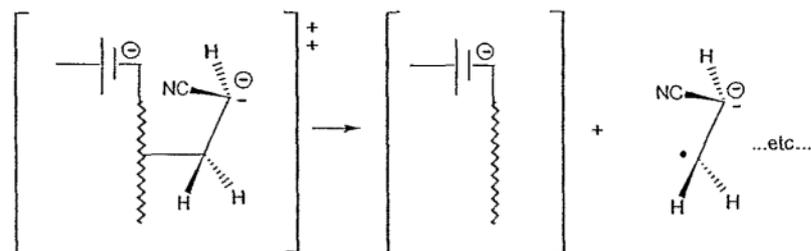
procedimiento son lentas.

- Ahora bien, desde los años 1980, se sabe realizar el electroinjerto de polímeros procedentes de monómeros vinílicos o cíclicos sobre superficies conductoras y semiconductoras de la electricidad, tal y como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP-A-0038244. Este procedimiento permite realizar enlaces químicos covalentes entre un
- 5 polímero orgánico y una superficie conductora o semiconductoras de la electricidad. Estas capas orgánicas se constituyen, *a priori*, en candidatos ideales como capa de recubrimiento de anclaje de moléculas orgánicas u organometálicas, puesto que, cuando se injerta una cadena de polímero en un punto de la superficie, se injerta un gran número de grupos funcionales por sitio de superficie: el número de puntos de anclaje de una molécula orgánica por unidad de superficie se ve entonces multiplicado. No obstante, no es nada fácil la utilización de los polímeros
- 10 electroinjertados tales como se describen en este documento anterior, ya que las características del procedimiento no permiten injertar directamente sobre la superficie una variedad suficiente de grupos funcionales utilizables. Por "injerto directo", se entiende el hecho de utilizar monómeros vinílicos o cíclicos que incluyen los grupos funcionales que se desea fijar sobre la superficie, o que incluyen precursores simples originales (es decir, precursores que no son sólo grupos protegidos) de grupos funcionales deseados.
- 15 Por otro lado, ya se ha propuesto, especialmente en la solicitud de patente EP 0665275, formar una película polimérica a partir de monómeros electroinjertables según un procedimiento en cuyo transcurso se interrumpe con grupos funcionales el crecimiento de las cadenas. De este modo, según este procedimiento, los grupos funcionales de interés no son emplazados directamente sobre el monómero que se utilizará para el electroinjerto, sino que esencialmente interrumpen el crecimiento con un inhibidor portador del grupo funcional buscado. Se señala en
- 20 particular que este procedimiento tan solo proporciona un grupo funcional por cadena y no permite disponer de un gran número de grupos accesibles, lo cual es especialmente perjudicial cuando la molécula sonda es voluminosa. Además, se ha demostrado que el crecimiento de las cadenas poliméricas sobre la superficie es necesariamente aniónico (C. Bureau *et al.*, *Macromolecules*, 1997, 30, 333), y es probable que los inhibidores radicalarios introducidos según este procedimiento aparezcan en la película en el final de la síntesis porque son adsorbidos y/o
- 25 reducidos en la superficie del electrodo (en general, son electroactivos), y no porque interrumpen el crecimiento de las cadenas.
- Por cómo se conciben en la actualidad los mecanismos del electroinjerto y por las ideas preconcebidas que llevan asociados, es como pueden comprenderse los motivos por los que el experto en la materia no se ha orientado hacia la utilización de monómeros que presentan grupos funcionales variados.
- 30 Parece asumirse a día de hoy que la obtención de películas poliméricas injertadas por electroinjerto de monómeros vinílicos activados sobre superficies conductoras procede merced a una electroiniciación de la reacción de polimerización a partir de la superficie, seguida de un crecimiento de las cadenas, monómero a monómero (C. Bureau, *et al.*, 1997, citado anteriormente; C. Bureau and J. Delhalle, *Journal of Surface Analysis*, 1999, 6(2), 159 y C. Bureau, *et al.*, *Journal of Adhesion*, 1996, 58, 101).
- 35 Esta reacción de polimerización se representa en el esquema A que sigue:

Esquema A



1: Reacción química de superficie, injerto



2: Desorción, polimerización en disolución

En este esquema, la reacción de injerto se corresponde con la etapa 1, donde el crecimiento tiene lugar a partir de la superficie. La etapa 2 es la reacción parásita principal, que conduce a la obtención de un polímero no injertado.

- 5 Por lo tanto, el crecimiento de las cadenas injertadas se efectúa por polimerización puramente química, es decir, independientemente de la polarización de la superficie conductora que ha dado lugar al injerto. Por lo tanto, esta etapa es sensible a (y se ve en particular interrumpida por) la presencia de inhibidores químicos de este crecimiento.

- 10 En el ejemplo de la reacción representada en el citado esquema A, donde se toma el electroinjerto del acrilonitrilo bajo polarización catódica, el crecimiento de las cadenas injertadas se efectúa mediante polimerización aniónica. Este crecimiento se ve interrumpido especialmente por protones, y se ha demostrado que el contenido de protones constituye incluso el parámetro capital que rige la formación de polímero en disolución, así como la información recuperada en fase de síntesis, y especialmente el desarrollo de los voltamogramas que acompañan la síntesis (C. Bureau, Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999, 479, 43).

- 15 Las trazas de agua y, de manera más general, los protones lábiles de disolventes próticos constituyen fuentes de protones perjudiciales para el crecimiento de las cadenas injertadas. Incluso antes de que se hubieran comprendido los mecanismos reaccionales del electroinjerto de monómeros vinílicos, este punto técnico obstaculizador había sido identificado claramente por el experto en la materia.

Esta es la razón por la se revela imposible contemplar una reacción de electropolimerización que ponga en práctica monómeros que incluyen grupos funcionales fuentes de protones (monómeros próticos).

- 20 Debido a las serias limitaciones que recaen a la vez sobre los disolventes y los tipos de monómeros de síntesis, el electroinjerto de monómeros vinílicos sobre las superficies conductoras o semiconductoras de la electricidad no deja de ser un procedimiento que tan solo permite el injerto de polímeros de relativamente escaso interés desde el punto de vista de la funcionalización química de las superficies.

Por este motivo, las películas de polímeros electroinjertados se han utilizado sobre todo para realizar funciones pasivas: anticorrosión o lubricación, tal y como ya se ha descrito, por ejemplo, en las solicitudes de patente EP-A-0038244 y FR-A-2672661.

5 La solicitud internacional WO 02/098926, publicada el 12 de diciembre de 2002, describe asimismo un procedimiento de funcionalización por electroinjerto de superficies conductoras de la electricidad, revistiéndose las superficies conductoras con un polímero portador de grupos susceptibles de ligarse a grupos reactivos complementarios.

10 Existe, pues, una necesidad de poder realizar la funcionalización de superficies conductoras o semiconductoras de la electricidad mediante capas orgánicas que presenten una gran variedad de grupos funcionales, así como un gran número de grupos funcionales de interés accesibles por unidad de superficie, al objeto de asegurar reacciones de posfuncionalización más rápidas que las disponibles en la actualidad.

La firma solicitante se ha fijado en particular como objetivo resolver el problema de interfase mineral/orgánica al objeto de proveer un soporte conductor o semiconductor de la electricidad que incluye una zona de anclaje funcionalizada o "velcro® molecular" útil para la fijación de moléculas de interés (moléculas sonda) o de objetos portadores de una función complementaria.

15 Los detalles técnicos de la presente Invención, así como los ejemplos de realización, demuestran que en especial es posible, contrariamente a la enseñanza de la técnica anterior, obtener grupos funcionales próticos –ya sea directamente, o bien indirectamente– por electroinjerto, recurriendo a monómeros vinílicos o cíclicos a su vez portadores de grupos próticos.

20 La presente invención tiene, pues, como primer objeto un soporte sólido que incluye al menos una región conductora y/o semiconductor de la electricidad con óxido reducible en su superficie, caracterizado por el hecho de que al menos una zona de dicha superficie está funcionalizada con una película orgánica electroinjertada obtenida a partir de precursores orgánicos electroactivos que incluyen cada uno de ellos al menos un grupo funcional de interés, seleccionándose dichos precursores orgánicos de entre los monómeros vinílicos o cíclicos portadores de grupos próticos, eventualmente en mezcla con precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés, y por el hecho de que el número de grupos funcionales de interés accesibles para la formación de un enlace covalente, iónico o de hidrógeno con un grupo complementario en el seno de dicha película representa al menos el 90 % del número total de los grupos orgánicos funcionales de interés.

30 Una de las singularidades importantes de la presente invención es que se realiza, por electroinjerto de revestimientos orgánicos, un tapiz de grupos funcionales de interés, una gran parte de los cuales es accesible para reacciones de posfuncionalización –típicamente más del 90 %–.

El electroinjerto de revestimientos orgánicos permite fabricar enlaces de interfase de naturaleza covalente entre un material conductor o semiconductor de la electricidad y un material orgánico.

35 La película orgánica funcionalizada del soporte conforme a la presente invención constituye un auténtico "velcro® molecular" sobre el cual a continuación se puede sacar provecho directamente de todas las propiedades del precursor que se ha electroinjertado, ya se trate de propiedades químicas como físicas, para fijar en ella objetos diversos, como por ejemplo moléculas (químicas o bioquímicas), polímeros, células, o incluso obtener una función de pegado frente a un objeto macroscópico, por ejemplo por adhesión química sobre el precursor injertado.

40 De acuerdo con la presente invención, se entiende por grupo funcional de interés accesible, un grupo funcional suficientemente disponible, especialmente en términos estéricos, para formar enlaces covalentes, iónicos o enlaces de hidrógeno con un grupo complementario de un tamaño comparable al suyo. La molécula portadora de este grupo funcional complementario se denominará molécula sonda.

45 Por grupos complementarios, se entiende grupos funcionales de la química orgánica u organometálica con posibilidad de reaccionar o interaccionar unos con otros para dar aductos suficientemente estables para originar una fijación entre las dos entidades químicas –el revestimiento y la molécula sonda– que los portan. Dentro de este ámbito, puede tratarse, por tanto, de grupos electrófilos o ácidos de Lewis, como los carbonilos, los carboxilos, los isocianatos, los epóxidos, los dienófilos..., aptos para reaccionar con grupos nucleófilos o bases de Lewis como las aminas, los alcoholes, los tioles, los dienos y polienos...; de grupos donadores de enlaces H como las aminas, los alcoholes, los tioles, los ácidos carboxílicos..., aptos para reaccionar con los donadores de dobletes libres como las aminas, los alcoholes, los tioles, los carboxilos, los carbonilos, los enlaces insaturados ricos en electrones...; de grupos catiónicos, como los amonios, los antimonios, los sulfonios, los diazonios..., aptos para reaccionar con los grupos aniónicos como los carboxilatos, los fosfatos, los fosfonatos, los sulfatos, los sulfonatos,... Se podrá encontrar fácilmente, en cualquier monografía de química orgánica, una lista más exhaustiva de las parejas de grupos funcionales complementarios.

55 La accesibilidad de los grupos funcionales de interés puede ser evaluada, cuantitativamente, midiendo por ejemplo el grado de conversión de estos grupos funcionales (por ejemplo, por espectroscopia, infrarroja, UV-visible, de fotoelectrones, etc.) al realizar la reacción del revestimiento que contiene estos grupos con una molécula sonda que

contiene un grupo funcional complementario. Si la molécula sonda es de tamaño pequeño, probablemente podrá, en efecto, reaccionar con todos los grupos funcionales de interés del revestimiento.

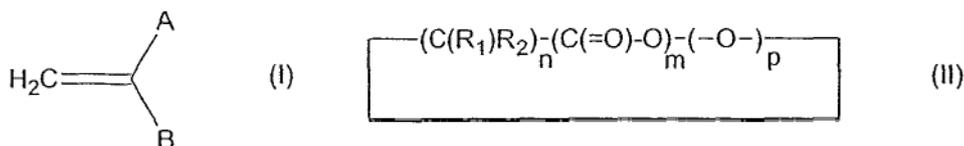
De acuerdo con la invención, se entiende por precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés, todo grupo orgánico eventualmente funcionalizado, pero incapaz de formar enlaces covalentes, iónicos o enlaces de hidrógeno con el grupo complementario dado y tal como se ha definido anteriormente.

La ventaja de un soporte que incluye un revestimiento con un gran número de funciones accesibles se expresa todavía más cuando se trata de fijar un objeto de tamaño grande a muy grande frente al del grupo funcional (típicamente, los objetos de tamaño superior al nanómetro y, *a fortiori*, superior a la decena, la centena de nanómetros, e incluso al micrómetro). En esta situación, no serán utilizados todos los grupos de interés accesibles del revestimiento, sino que estarán en número suficiente para adecuarse lo mejor posible a las restricciones estéricas y, más en general, a la topología del objeto que se desea fijar a este revestimiento.

Generalmente, los precursores orgánicos se seleccionan de entre:

- 15 - los monómeros polimerizables y electroinjetables portadores de al menos un grupo funcional orgánico de interés. La película orgánica electroinjetada obtenida es entonces un polímero;
- los monómeros polimerizables y electroinjetables portadores de al menos un grupo funcional que permite obtener simplemente, por derivatización, el grupo orgánico funcional reactivo de interés buscado. También se dice que se trata de monómeros portadores de sintones de los grupos funcionales reactivos de interés buscados. La película orgánica electroinjetada obtenida es entonces un polímero;
- 20 - las moléculas, macromoléculas y objetos funcionalizados con monómeros tales como los anteriormente descritos. La película orgánica obtenida, entonces, no necesariamente es de naturaleza polimérica.

De entre los monómeros polimerizables, cabe citar en particular los monómeros vinílicos activados y las moléculas escindibles por ataque nucleofílico, que respectivamente respondan a las fórmulas (I) y (II) siguientes:



25 en las cuales:

- A, B, R₁ y R₂, iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un radical de alquilo C₁-C₄, un radical nitrilo o una función orgánica seleccionada de entre las funciones hidroxilo, amino: -NH_x con x = 1 ó 3, tior, ácido carboxílico, éster, amida: -C(=O)NH_y en la que y = 1 ó 2, imida, imidoéster, aromático y especialmente piridina, estireno o halógeno estireno, halogenuro de ácido: -C(=O)X en la que X representa un átomo de halógeno seleccionado de entre el flúor, el cloro y el bromo, anhídrido de ácido: -C(=O)OC(=O), nitrilo, succinimida, ftalimida, isocianato, epóxido, siloxano: -Si(OH)_z en la que z es un número entero comprendido entre 1 y 3, ambos inclusive, benzoquinona, carbonilo-diimidazol, para-tolueno sulfonilo, para-nitrofenil cloroformiato, etilénico y vinílico o un grupo orgánico (o brazo espaciador) portador de al menos una de las funciones anteriormente enumeradas tales como los grupos que incluyen varias funciones vinílicas como, por ejemplo, el penta-eritritol tetra-metacrílico; entendiéndose que uno al menos de A y B y que uno al menos de R₁ y R₂ representa una de dichas funciones orgánicas o un grupo orgánico portador de al menos una de dichas funciones;
- n, m y p, iguales o diferentes, son números enteros comprendidos entre 0 y 20, ambos inclusive.

40 En la anterior notación, R₁ y R₂ son grupos que dependen de un índice i no indicado, estando i comprendido entre 0 y n. Esto expresa el hecho de que los grupos R₁ y R₂ pueden, en realidad, ser diferentes de un (C(R₁)R₂) a otro en la estructura de las moléculas cíclicas de fórmula (II) anterior.

De entre los monómeros vinílicos activados de fórmula (I) anterior, según la invención cabe citar especialmente el hidroxietilmetacrilato (HEMA), el acrilato y el metacrilato de glicidilo, el ácido acrílico, el ácido metacrílico, el aminopropil metacrilamida, y el aminohexil metacrilamida.

45 De entre las moléculas escindibles por ataque nucleofílico de fórmula (II) anterior, cabe citar especialmente óxidos de etileno sustituidos.

De acuerdo con la invención, la superficie conductora o semiconductora de la electricidad es preferentemente una superficie de acero inoxidable, de acero, de hierro, de cobre, de níquel, de cobalto, de niobio, de aluminio

(especialmente cuando está recientemente cepillado), de plata, de titanio, de silicio (dopado o no), de nitruro de titanio, de nitruro de tungsteno, de nitruro de tantalio o una superficie metálica noble seleccionada de las superficies de oro, de platino, de iridio o de platino iridiado; siendo las superficies de oro particularmente preferidas según la invención.

- 5 Sobre el soporte conforme a la invención, la densidad de los grupos funcionales de interés accesibles está preferentemente comprendida entre $10^4/\mu\text{m}^2$ y $10^{10}/\mu\text{m}^2$.

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de preparación de un soporte tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado por el hecho de consistir en realizar el electroinjerto, en una sola etapa, de precursores orgánicos electroactivos sobre al menos una zona de al menos una región conductora y/o
10 semiconductora de la electricidad con óxido reducible en su superficie de un soporte sólido, por electrólisis en medio orgánico, de una composición que encierra, en dicho medio orgánico, al menos un precursor orgánico electroactivo que incluye al menos un grupo funcional de interés, mediante puesta en contacto de dicha composición con dicha zona, sometiéndose esta última a un protocolo de potencial en cuyo transcurso es llevada, durante la totalidad o parte del protocolo de potencial (voltamétrico, potencioestático, multiescalón, etc.), a un potencial superior o igual a un
15 potencial eléctrico umbral determinado con respecto a un electrodo de referencia, siendo dicho potencial eléctrico umbral el potencial rebasando el cual se produce el injerto de dichos precursores, y por el hecho de que se obtiene un porcentaje de accesibilidad en grupos funcionales de interés de al menos el 90 % (en número):

- a) ajustando el protocolo de potencial, y especialmente el número de barridos y la velocidad de barrido en un
20 protocolo repetitivo (barridos voltamétricos, multiescalón, etc.) al objeto de conllevar un porcentaje de injerto inferior o igual al 60 %, y/o
- b) mediante la utilización de una composición en la que los precursores orgánicos electroactivos funcionalizados están presentes en mezcla con precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés, representando entonces estos últimos del 0,1 % al 95 % del número total de precursores presentes en el seno de dicha composición, y/o
- 25 c) mediante la utilización de precursores orgánicos electroactivos seleccionados de entre aquellos en los cuales el grupo funcional de interés es llevado en el extremo de un brazo espaciador.

Mediante este procedimiento, se puede funcionalizar la superficie con diversos grupos orgánicos, y realizar un auténtico "velcro® molecular" sobre el cual a continuación se puede sacar provecho directamente de todas las propiedades del polímero que se ha injertado, ya se trate de propiedades químicas como físicas, para fijar en ella
30 "objetos" diversos, como por ejemplo moléculas (químicas o bioquímicas), polímeros, células, o incluso obtener una función de pegado frente a un objeto macroscópico, por ejemplo por adhesión química sobre el polímero injertado.

Este resultado es inesperado, dado que todo grupo reactivo presente en un monómero vinílico (que no sea el propio enlace covalente) es susceptible llevar a cabo reacciones parásitas e incluso de interrumpir o imposibilitar el crecimiento de las cadenas en la electropolimerización de las cadenas injertadas (véase, por ejemplo: G. Deniau, *et al.*, J. of Electroanalytical Chem., 1998, 451, 145).

Sin embargo, la idea de la presente invención obedece a que no es necesario asegurar un crecimiento de cadenas largas sobre la superficie para poder beneficiarse de la fijación de los grupos funcionales de interés de los que inicialmente son portadores los monómeros vinílicos funcionalizados. En esta línea, las reacciones parásitas, e incluso las reacciones de terminación, que pueden manifestarse debido a la presencia –en el monómero vinílico inicial– de grupos funcionales próticos o reactivos con respecto al extremo en crecimiento, no protegidos, son de escasa importancia, mientras no consuman la totalidad de los grupos funcionales de interés presentes en los precursores.

En particular, el electroinjerto de monómeros vinílicos o cíclicos portadores de grupos orgánicos de interés variados permite, por tanto, contemplar las películas orgánicas electroinjertadas como un medio de obtener, en una etapa, sobre las superficies conductoras y semiconductoras, aquello que se podría obtener en dos etapas al menos, pasando por la fabricación previa de una capa de óxido (por ejemplo, combinando fabricación de una capa de óxido y funcionalización química mediante un recubrimiento de adhesión bifuncional). El procedimiento conforme a la invención permite la formación de enlaces covalentes entre el metal y el polímero injertado, lo cual permite asegurar la fabricación de una capa que tiene una considerable contribución en la solidez de la interfase.

De acuerdo con este procedimiento, y en el caso de la variante a), el ajuste del protocolo de potencial permite, especialmente en el caso de los polímeros, ajustar el grado de injerto, es decir, el número de cadenas de polímeros injertadas por unidad de superficie: un grado de injerto moderado permitirá, por ejemplo, un espaciado de las cadenas suficiente para permitir la humectación del revestimiento en su espesor mediante un disolvente apropiado, así como la entrada en la película del revestimiento de moléculas sonda. De acuerdo con una forma preferida de
50 realización de esta variante a), el grado de injerto se ajusta a un valor comprendido entre el 10 y el 40 %.

En el caso de la variante b), los grupos funcionales de interés se espacian unos de otros efectuando el electroinjerto

- a partir de un mezcla de monómeros diferentes, de los cuales solo una parte es portadora de los grupos funcionales de interés que se desea ver presentes en el revestimiento final. Las proporciones relativas de los diferentes monómeros permiten entonces ajustar el número de grupos funcionales de interés y, con ello, su accesibilidad. De acuerdo con una forma preferida de realización de esta variante b), los precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés representan del 0,1 al 50 % del número total de precursores presentes en el seno de dicha composición.
- Las condiciones de concentración de precursor funcionalizado (monómero u otro) son variables de un precursor a otro. Sin embargo, se podrán considerar como preferibles las concentraciones comprendidas entre 0,1 y 10 mol/l, y en particular entre 0,1 y 5 mol/l en lo referente a los precursores orgánicos electroactivos que incluyen un grupo funcional de interés. Cuando hay presencia de precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés en el seno de la composición orgánica (variante b)), estos se hallan presentes entonces a una concentración preferentemente comprendida entre 10^{-3} y 18 mol/l, y aún más preferentemente entre 10^{-3} y 9 mol/l.
- De acuerdo con la variante c), se puede igualmente mejorar la accesibilidad de los grupos funcionales de interés emplazándolos en el extremo de un brazo espaciador, que por ejemplo puede ser una cadena de unos átomos de carbono. Este brazo espaciador habrá podido estar directamente presente en los precursores del revestimiento electroinjertado, o bien añadirse *a posteriori*. Estos brazos espaciadores encuentran su utilidad especialmente cuando el objeto que ha de fijarse sobre el revestimiento es de considerable tamaño: la fijación de un brazo espaciador sobre un revestimiento electroinjertado es más fácil que la de un objeto de considerable tamaño, ya que la molécula (sonda) que contiene el brazo espaciador por lo general es más pequeña que el objeto. Por lo tanto, ésta puede fijarse sobre la casi totalidad de los grupos funcionales de interés accesibles del revestimiento electroinjertado, y sustituirlos por grupos aún más accesibles.
- De acuerdo con este procedimiento, la electrólisis se realiza preferentemente por polarización en condiciones voltamétricas.
- El medio orgánico puesto en práctica a lo largo de este procedimiento se selecciona preferentemente de entre la dimetilformamida, el acetato de etilo, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano.
- Este medio orgánico puede encerrar además al menos un electrolito soporte que puede estar especialmente seleccionado de entre las sales de amonio cuaternario tales como los percloratos, los tosilatos, los tetrafluoroboratos, los hexafluorofosfatos, los halogenuros de amonio cuaternario, el nitrato de sodio y el cloruro de sodio.
- De entre estas sales de amonio cuaternario cabe citar en particular, a título de ejemplo, el perclorato de tetraetilamonio (TEAP), el perclorato de tetrabutilamonio (TBAP), el perclorato de tetrapropilamonio (TPAP), el perclorato de benciltrimetilamonio (BTMAP).
- Se obtiene, por ejemplo, una película de poli-metacrililoil-succinimida sobre oro realizando 10 barridos voltamétricos de $-0,4$ a $-2,8$ V/(Ag⁺/Ag) a 50 mV/s sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de 0,5 mol/l de metacrililoil-succinimida en DMF, en presencia de $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l de TEAP. Las funciones succinimida se detectan en espectroscopia por infrarrojos de reflexión/absorción (IRRAS) sobre la película obtenida, tras un aclarado de 5 minutos bajo ultrasonidos. Como a continuación se detalla en los ejemplos de realización, esta película injertada permite fácilmente el anclaje de poli-alilamina, por reacción de los grupos amino de la poli-alilamina con los grupos succinimida del poli-metacrililoil-succinimida electroinjertado.
- Se observa, por otro lado, que asimismo se puede obtener una película de poli-metacrililoil-succinimida 0,18 mol/l en el acetonitrilo, lo mismo sobre oro que sobre platino.
- De manera alternativa, se observa la formación de una película electroinjertada de poli-hidroxietil metacrilato (PHEMA) sobre oro realizando 10 barridos voltamétricos de $+1,0$ a $-3,0$ V/(Ag⁺/Ag) a 50 mV/s sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de 0,4 mol/l de hidroxietil metacrilato en DMF, en presencia de $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l de TEAP (Tetra Etil Amonio Perclorato). Se podrá apreciar que esta película se obtiene con un monómero portador de grupos hidroxilo no protegidos, mientras que la técnica anterior mencionaba que era necesario proteger estos grupos hidroxilo para realizar el electroinjerto del HEMA (véase especialmente la solicitud de patente EP-A-0665275). Como se detalla en los ejemplos de realización, esta película de PHEMA electroinjertada reacciona fácilmente con grupos diisocianato, para obtener una posfuncionalización de la superficie, lo cual muestra que no es necesario el crecimiento de las cadenas, obstaculizado no obstante por la presencia del grupo prótico, para obtener revestimientos electroinjertados que puedan servir de "velcro® molecular".
- La invención, finalmente, tiene por objeto la utilización del soporte conforme a la invención con carácter de recubrimiento de adhesión ("velcro® molecular") para la fijación de moléculas de interés (moléculas sonda) o de objetos portadores de una función complementaria.
- De acuerdo con una primera forma de realización ventajosa de esta utilización, el soporte conforme a la invención puede ser utilizado para la fijación de proteínas (avidina, anticuerpos, factores de crecimiento...). Las potenciales

aplicaciones conciernen, por ejemplo, a la realización de superficies bioactivas (angioplastia, prótesis bioactivas...) que favorecen la adhesión celular y eventualmente la recolonización; la realización de superficies que pueden servir para la clasificación celular selectiva (mediante fijación de anticuerpos específicos de la pared de una célula dada); la realización de matrices de chips de proteínas basadas en un soporte con lengüetas conductoras.

5 De acuerdo con una segunda forma de realización ventajosa de esta utilización, el soporte conforme a la invención puede ser utilizado asimismo para la fijación de moléculas de ácido nucleico tales como moléculas de ADN, de ARN o de oligonucleótidos, por ejemplo para la realización de superficies bioactivas (oligonucleótidos antisentido), o de lengüetas de anclaje para los chips de análisis químico o bioquímico, como por ejemplo los chips de ácido nucleico tales como los chips de ADN.

10 De acuerdo con una tercera forma de realización ventajosa de esta utilización, el soporte conforme a la invención puede ser utilizado asimismo para la fijación de oligosacáridos y, de manera más general, de biomateriales (polímeros biocompatibles tales como polisacáridos como, por ejemplo, los dextranos, cerámicas, etc.), por ejemplo para la realización de superficies biocompatibles o con propiedades encapsulantes.

15 Finalmente, de acuerdo con una cuarta forma de realización ventajosa de esta utilización, el soporte conforme a la invención puede ser utilizado asimismo para realizar el pegado de objetos sobre superficies conductoras o semiconductoras por reacciones químicas de superficie.

Además de las disposiciones que anteceden, la invención también comprende otras disposiciones que se irán desprendiendo de la descripción subsiguiente, que hace referencia a ejemplos de preparaciones de soportes conforme a la invención que incluyen una superficie recubierta con una película de poli-metacrililoil-succinimida, de poli-hidroxietilmetacrilato o de polimetacrilonitrilo (PMAN), un ejemplo que ilustra la utilización de un soporte recubierto con una película de poli-metacrililoil-succinimida electroinjertada con carácter de recubrimiento de adhesión para la fijación de poli-alilamina, a un ejemplo que ilustra la utilización de un soporte recubierto por una película de poli-hidroxietilmetacrilato con carácter de recubrimiento de adhesión para la formación de un carbamato, a ejemplos que ilustran la utilización de un soporte que incluye una película de polimetacrilonitrilo con carácter de recubrimiento de adhesión para la fijación de diversas moléculas o macromoléculas, así como a las figuras 1 a 16 que se acompañan, en las cuales:

la figura 1 representa el espectro IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de poli-metacrililoil-succinimida electroinjertada;

30 la figura 2 representa el espectro IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de poli-metacrililoil-succinimida, posfuncionalizada con poli-alilamina;

la figura 3 representa el espectro IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de poli-hidroxietilmetacrilato;

la figura 4 representa el espectro IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de poli-hidroxietilmetacrilato tras reacción con el diisocianato hexano y formación de un carbamato;

35 la figura 5 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (espectro de la parte superior), tras reducción de los grupos nitrilo a amino (espectro de la parte media) y tras reacción de estos grupos amino con el anhídrido trifluoroacético para formar una amida (espectro de la parte inferior);

40 la figura 6 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (CN), tras reducción de los grupos nitrilo a amino por el aluminio-hidruro de litio (CH_2NH_2), tras reacción de estos grupos amino con el 1,6-diisocianato hexano para formar la urea ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NCO}$), y tras reacción sobre el trifluoroetanol para formar el carbamato ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOOCH}_2\text{CF}_3$);

45 la figura 7 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (CN), tras reducción de los grupos nitrilo a amino por el aluminio-hidruro de litio (CH_2NH_2), tras reacción de estos grupos amino con el 1,6-diisocianato hexano para formar la urea ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NCO}$), y tras reacción sobre la hidroxietilcelulosa para formar el correspondiente carbamato;

la figura 8 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada sobre la cual se ha injertado hidroxietilcelulosa y el de una pastilla de KBr que encierra hidroxietilcelulosa;

50 la figura 9 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada tras hidrólisis de los grupos nitrilo y amido (tratamiento ácido) y luego en ácido carboxílico (tratamiento básico);

la figura 10 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada sobre la cual se ha injertado avidina;

la figura 11 representa la región P_{2p} del espectro realizado por espectroscopia de fotoelectrones X (XPS) de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (a); tras fijación de avidina (b) y tras fijación de avidina y de un oligonucleótido biotinilado en su extremo 5';

5 la figura 12 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (a), sobre la cual se fijó un anticuerpo anti-IgG de conejo (b), tratada mediante una disolución de antígeno específico (c);

la figura 13 representa los espectros IRRAS de una superficie de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada (a), sobre la cual se redujeron los grupos nitrilo (b), se trataron mediante el anhídrido glutárico para formar amidas (c) y, luego, mediante el anhídrido trifluoroacético (d);

10 la figura 14 representa los espectros IRRAS de la figura 13 (d), tras reacción con un oligonucleótido de hebra sencilla en posición 5', y luego con un segundo oligonucleótido complementario del primero;

la figura 15 representa la región P_{2p} del espectro XPS de la película de la figura 13 (d) tras reacción con un oligonucleótido de hebra sencilla aminado en posición 5' y, luego, con un segundo oligonucleótido complementario del primero; y

15 figura 16 representa el espectro IRRAS de una película de dextrano funcionalizada con grupos glicidilmetacrilato electroinjertada (espectro alto) y el espectro del dextrano funcionalizado con grupos glicidilmetacrilato antes del electroinjerto (espectro bajo).

Los ejemplos 1 y 3 a 11 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1: fijación de poli-alilamina por mediación de una película de poli-metacrililoil-succinimida electroinjertada

20 Este ejemplo ilustra a la vez el electroinjerto de un monómero portador de un grupo funcional de interés que puede entrar en la funcionalización con una molécula orgánica (grupo succinimida, electrófilo), y la propia reacción de posfuncionalización a través de la reacción de aminas (nucleófilos) sobre los grupos succinimida del polímero electroinjertado. La sonda portadora de los grupos amino es un polímero, la poli-alilamina, y la reacción de posfuncionalización, por tanto, es una reacción polímero-sobre-polímero, lo cual ilustra la gran accesibilidad de los grupos succinimida del revestimiento electroinjertado.

25

a) Formación de una película de poli-metacrililoil-succinimida electroinjertada

Se realizan 10 barridos voltamétricos de $-0,3$ a $-2,5$ V (Ag^+/Ag) a 50 mV/s sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de $0,18$; $0,25$ ó $0,5$ mol/l de metacrililoil-succinimida (MASU) en DMF, en presencia de $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l de TEAP. Se obtiene una película de poli-metacrililoil-succinimida, como así prueba el espectro IRRAS de la superficie, representado en la figura 1 que se acompaña, que presenta las bandas carbonilo características a 1782 y 1746 cm^{-1} (transmitancia en % en función de la longitud de onda en cm^{-1}).

30

Este espectro IRRAS se realizó tras aclarado con acetona durante 5 minutos bajo ultrasonidos.

La tabla I que sigue resume las características IRRAS (intensidad de la banda C=O de los grupos succinimida) en función de las condiciones de síntesis.

35 En esta tabla, VC indica un barrido en condiciones voltamétricas; los extremos de potencial indicados se señalan con relación a un electrodo de plata.

Tabla I

Medio electroquímico TEAP/DMF	Condiciones de síntesis tipo de la película	Caracter. IRRAS % C=O
MASU 0,18 M	5*1 VC, 50 mV/s de -0,6 a -2,8	7,78
MASU 0,18 M	5 VC, 50 mV/s de -0,6 a -2,8	7,13
MASU 0,25 M	10 VC, 50 mV/s de -0,3 a -2,5	17,2
MASU 0,5 M	10 VC, 50 mV/s de -0,6 a -2,5	45
MASU 0,5 M	10 VC, 50 mV/s de -0,4 a -2,8	55

b) Reacción de posfuncionalización: fijación de la poli-alilamina

- 5 En un tubo bruñido dotado de un agitador magnético, se introducen 20 ml de agua desionizada, y luego 0,5 ml de una disolución de poli-alilamina al 20 % en peso en el agua desionizada. A continuación se introduce la lámina de oro portadora de una película de poli-metacrilol-succinimida electroinjertada, obtenida según el anterior protocolo. La lámina se deja, en agitación, durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente.

10 A continuación se saca del tubo, se aclara con agua desionizada a chorros, luego con ultrasonidos en el agua desionizada durante 2 minutos y, finalmente, se seca bajo flujo de nitrógeno.

Se observa por IRRAS (figura 2) la disminución de las bandas características de los grupos succinimida a 1746 y 1782 cm^{-1} , y la aparición de las bandas características de la poli-alilamina, y especialmente la banda amida ν_{CO} a 1656 cm^{-1} , las bandas de elongación ν_{CN} y deformación δ_{NH} a 1574 cm^{-1} , y la banda de elongación ν_{NH} a 3254 cm^{-1} .

15 Ejemplo 2: formación de un carbamato por reacción del diisocianato hexano sobre los grupos hidroxilo de una película de poli-hidroxietilmetacrilato (PHEMA) electroinjertada

20 Este ejemplo ilustra el electroinjerto de un monómero portador de grupos hidroxilo (el HEMA), y la formación de una película de PHEMA, así como la utilización de los grupos hidroxilo del PHEMA para reaccionar con los grupos isocianato del diisocianato hexano para formar un carbamato. Asimismo, ilustra la gran accesibilidad de los grupos hidroxilo del polímero electroinjertado frente a la molécula sonda que constituye el diisocianato hexano, puesto que en la reacción se convierte la totalidad de los grupos.

a) Formación de una película de PHEMA

25 Se realiza una película de PHEMA sobre oro mediante 10 barridos voltamétricos a 50 mV/s de -2,4 a +1 V (Ag⁺/Ag) sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de 2,7 mol/l de hidroxietil-metacrilato (HEMA) en DMF, en presencia de 5.10⁻² mol/l de TEAP. En la figura 3 se presenta el espectro IRRAS de la película obtenida. Se comprueba la presencia de la banda carbonilo característica a 1737 cm^{-1} . Asimismo se observa una banda hacia 3500 cm^{-1} debida a los grupos hidroxilo de los brazos hidroxietilo del polímero.

b) Reacción de posfuncionalización: fijación del diisocianato hexano

En un tubo bruñido seco, se introducen 30 ml de tolueno secado sobre tamiz molecular de 4 Å, 1,5 ml de diisocianato hexano al 5 % en volumen en tolueno y 2 gotas de 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-undec-7-eno (DBU).

30 A continuación se introduce la lámina de oro recubierta con una película de PHEMA electroinjertada obtenida anteriormente en la etapa precedente, previamente inmersa en y recubierta con una capa de tolueno seco.

Se cierra el tubo y luego se deja reaccionar a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 142 horas. La

lámina se saca, se aclara con tolueno seco y luego con acetona seca a chorros. A continuación se seca con nitrógeno.

En la figura 4 se representa el espectro IRRAS de la lámina realizada tras la reacción con el diisocianato hexano y formación del carbamato.

- 5 Se observa la aparición de las bandas de elongación ν_{NH} a 3330 cm^{-1} , de la banda isocianato $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ a 2264 cm^{-1} . La banda a 1623 cm^{-1} se debe probablemente a la presencia de DBU residual. Asimismo se observa la desaparición de la banda hacia 3500 cm^{-1} debida a los grupos hidroxilo, lo cual muestra que la conversión de estos grupos ha sido cuantitativa y que, por tanto, eran accesibles todos ellos para la molécula sonda.

- 10 Ejemplo 3: obtención de grupos amino sobre una lámina de oro por reducción de los nitrilos de una película de polimetacrilonitrilo electroinjetada

Este ejemplo ilustra la utilización de los grupos nitrilo de una película de poli-metacrilonitrilo (PMAN) como precursores de grupos amino, y la reactividad de estos grupos amino mediante formación de amidas con el anhídrido trifluoroacético. También en este punto, la reacción de funcionalización es cuantitativa, lo cual muestra que los grupos nitrilo, y luego amino, son muy accesibles.

- 15 a) Preparación de una lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjetada

Se realiza una película de PMAN sobre oro efectuando 10 barridos voltamétricos de $-0,5$ a $-2,7 \text{ V}/(\text{Ag}^+/\text{Ag})$ a 50 mV/s sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de $2,5 \text{ mol/l}$ de metacrilonitrilo en DMF, en presencia de $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ de TEAP. Se identifican los grupos nitrilo del polímero formado mediante la banda a 2235 cm^{-1} en IRRAS.

- 20 b) Reacción de posfuncionalización: formación de amidas con el anhídrido trifluoroacético

- 25 En un tubo equipado con un septum, se introduce la lámina recubierta con la película de PMAN obtenida anteriormente en la etapa a), bajo flujo de nitrógeno. Se cierra el septum, seguidamente se introducen bajo atmósfera de argón, con ayuda de una jeringa purgada, 20 ml de piridina secada sobre tamiz molecular, y 1 ml de una disolución de 1 mol/l de aluminio-hidruro de litio LiAlH_4 en tetrahidrofurano (THF) secado sobre tamiz molecular. Se deja la lámina en el medio de reacción durante 2 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. La lámina se aclara a continuación con piridina mediante remojo durante 5 minutos, luego con agua desionizada a chorros, se seca bajo flujo de nitrógeno, se trata con ultrasonidos durante 1 minuto en una disolución de 1 mol/l de sosa, se aclara con agua desionizada y luego se seca bajo flujo de nitrógeno.

- 30 La figura 5 que se acompaña representa el espectro IRRAS de la lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjetada (arriba), tras reducción de los grupos nitrilo a amino mediante el aluminio-hidruro de litio (parte central), y tras reacción de estos grupos amino con el anhídrido trifluoroacético para formar la amida (abajo).

Se observa la desaparición de la banda de elongación de los nitrilos a 2235 cm^{-1} , y la aparición de la banda de elongación ν_{NH} de los grupos NH_2 entre 3250 y 3450 cm^{-1} , la banda de elongación asimétrica de los $\text{CH}_2(\text{NH}_2)$ a 2929 cm^{-1} y la banda de deformación de los NH_2 a 1642 cm^{-1} , características de la formación de poli-alilamina.

- 35 Ejemplo n.º 4: reactividad de los grupos amino formados según el modo de realización del ejemplo n.º 3

Este ejemplo tiene por finalidad comprobar que los grupos amino que se fabricaron anteriormente en el ejemplo 3 son accesibles y conservan su reactividad. Esto se realiza mediante amidación de las funciones amino, según el modo operativo descrito en J. Org. Chem., 1989, 54, 2498, y adecuado al caso presente para una reacción sobre una superficie de oro.

- 40 En un tubo, se realizan 20 ml de una disolución de $0,35 \text{ mol/l}$ de anhídrido trifluoroacético en THF. Se remoja la lámina obtenida al término del ejemplo 3 durante 2 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón (septum). La lámina se saca, se aclara con THF seco y luego se seca bajo flujo de nitrógeno.

- 45 El revestimiento obtenido se analiza por IRRAS (no representado), y es perfectamente característico de la formación de grupos amido a partir de las aminas: se observa la aparición de la banda amido a 1694 cm^{-1} , la banda de alargamiento CN y de deformación N-H a 1572 cm^{-1} , la banda de elongación C-F a 1209 cm^{-1} con, hacia 1250 cm^{-1} , la banda de deformación CNH. Al mismo tiempo, se observa la casi total desaparición de la banda de elongación de las aminas hacia 2929 cm^{-1} .

Ejemplo 5: reactividad de los grupos amino formados en el ejemplo 3; reacción con el 1,6-diisocianato hexano, formación de la urea

- 50 En este ejemplo se ilustra la reacción de los grupos amino formados en el ejemplo n.º 3 con un agente acoplante bifuncional, para formar una urea. La urea formada en la superficie se aprovecha para fijar en ella un alcohol. El modo operativo de síntesis de la urea en superficie está adaptado de Org. Synth., 1988, VI, 951.

En un tubo, se introducen 30 ml de una disolución de 1,6-diisocianatohexano ($\text{ONC}-(\text{CH}_2)_6\text{-NCO}$) al 5 % en volumen en el tolueno seco (secado sobre tamices moleculares de 4 Å). Se introduce una lámina de oro portadora de una película electroinjetada que contiene grupos amino, y tal como se obtiene a partir del ejemplo n.º 3, recubierta con una capa de tolueno seco. Se deja reaccionar la lámina durante 22 horas a temperatura ambiente con agitación magnética, bajo atmósfera de argón. Se saca del tubo, se aclara con chorros de tolueno seco y luego se seca bajo flujo de nitrógeno.

La película obtenida, en efecto, se hace reaccionar con el trifluoroetanol según el siguiente protocolo: en un tubo, se introducen 30 ml de tolueno seco (tamiz molecular de 4 Å), 1,5 ml de trifluoroetanol y 3 gotas de DBU. Se coloca en él la lámina portadora de la película electroinjetada modificada con el 1,6-diisocianatohexano, recubierta con una capa de tolueno seco. La lámina se deja en contacto con la disolución, bajo atmósfera de argón y con agitación magnética, durante 88 horas a temperatura ambiente. La lámina se saca, se aclara con tolueno seco, luego con acetona, con agua desionizada y, finalmente, con chorros, y se seca bajo flujo de nitrógeno.

La figura 6 que se acompaña muestra los espectros IRRAS de la lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjetada (CN), tras reducción de los grupos nitrilo a amino por el aluminio-hidruro de litio (CH_2NH_2), tras reacción de estos grupos amino con el 1,6-diisocianatohexano para formar la urea ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NCO}$), y tras reacción sobre el trifluoroetanol para formar el carbamato ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOOCH}_2\text{CF}_3$).

Se observan las bandas de alargamiento $\nu_{\text{N-H}}$ a 3330 cm^{-1} , la banda de elongación $\text{O}=\text{C}=\text{N}$ a 2271 cm^{-1} , así como las bandas urea a 1633 y 1576 cm^{-1} , pruebas de la reacción de los grupos amino iniciales con al menos uno de los dos grupos isocianato del 1,6-diisocianatohexano. La banda $\text{O}=\text{C}=\text{N}$ muestra, además, que una parte de los sitios isocianato permanece disponible, lo cual queda comprobado por la utilización de estos grupos para reaccionar con un alcohol.

Tras reacción sobre el trifluoroetanol para formar el carbamato ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOOCH}_2\text{CF}_3$), el espectro IRRAS de la lámina obtenida muestra asimismo la banda $\text{C}=\text{O}$ del carbamato a 1722 y a 1590 cm^{-1} (coincidente con la de la urea), la banda CH_2O ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}-$) a 1256 cm^{-1} , y las bandas de elongación de los enlaces C-F a 1179 cm^{-1} . También se señala la desaparición de la banda NCO a 2271 cm^{-1} .

De nuevo en este punto, la conversión de los grupos funcionales realizados sucesivamente sobre el revestimiento es cuantitativa, lo cual muestra su gran accesibilidad.

Ejemplo 6: utilización de los grupos funcionales de una película de polímero electroinjetada para fijar hidroxietilcelulosa

En este punto se ilustra el hecho de que la urea formada en el citado ejemplo 5 permite asimismo la fijación de hidroxietilcelulosa y, de manera más general, de los polisacáridos. Esta vía ilustra la reacción de una macromolécula de estructura tridimensional compleja, cuyo anclaje se hace posible por la gran accesibilidad de los grupos funcionales de interés sobre el revestimiento electroinjetado. Es interesante porque permite la fijación de polímeros o de macromoléculas que son difíciles de fijar sobre superficies conductoras de la electricidad y, en particular, sobre los metales, y cuyo interés está en abrir el camino hacia la realización de superficies biomiméticas (heparina, dextranos modificados, ácido hialurónico, etc.) sobre metales, y de módulo de fijación de moléculas de interés biológico complejas (ADN, proteínas, factores de crecimiento, etc.).

Se realiza una lámina de oro recubierta con una película electroinjetada modificada con 1,6-diisocianatohexano y portadora de grupos isocianato libres, como se describe en el citado ejemplo 5.

En un tubo, se introducen 30 ml de DMF secada sobre tamiz molecular de 4 Å. La disolución se desgasifica borboteando argón durante 10 minutos. A continuación se introducen 0,6 g de hidroxietilcelulosa, y se calienta la disolución a 60 °C para obtener la disolución, con agitación magnética durante 15 minutos. Se adicionan a continuación 5 gotas de DBU, con posterior introducción de la lámina portadora de grupos isocianato, recubierta con su disolución de síntesis (tolueno y 1,6-diisocianatohexano en exceso). La lámina se deja reaccionar durante 46 horas a 50 °C bajo atmósfera de argón y con agitación magnética. La lámina se saca y se aclara durante una hora en agua desionizada con agitación magnética.

En la figura 7 que se acompaña se representan los espectros IRRAS del soporte así obtenido. En esta figura, puede verse el espectro de una lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjetada (CN), el de la lámina tras reducción de los grupos nitrilo a amino por el aluminio-hidruro de litio (CH_2NH_2), y luego con posterior reacción de estos grupos amino con el 1,6-diisocianatohexano para formar la urea ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NCO}$) y, finalmente, tras reacción sobre la hidroxietilcelulosa para formar el carbamato ($\text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_2$ hidroxietilcelulosa). Se observa la banda carbamato secundaria a 1715 cm^{-1} , así como las bandas características de la hidroxietilcelulosa entre 1200 y 1000 cm^{-1} , que corresponden a las bandas de elongación de los grupos éter (COC) y alcohol (OH).

La figura 8 muestra, a efectos de comparación, el espectro de la película obtenida con la lámina de oro conforme a la invención y el de una pastilla de KBr que contiene hidroxietilcelulosa. Este espectro confirma la fijación de la

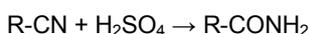
hidroxietilcelulosa sobre el soporte de la invención.

Ejemplo 7: película de PMAN electroinjertada precursora de grupos amido y ácido carboxílico sobre superficies conductoras y semiconductoras

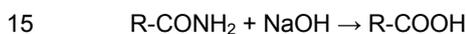
5 En este punto se ilustra el hecho de que se puede utilizar una película de PMAN tal como la obtenida anteriormente en el ejemplo 3 como precursor simple de grupos amido y ácido carboxílico sobre superficies metálicas. Esta transformación presenta la ventaja de culminar fácilmente en la formación de grupos reactivos diferentes de la película de partida, pero también de permitir la realización sencilla de superficies hidrófilas a partir de películas electroinjertadas hidrófobas (lo cual facilita especialmente la utilización de las películas como recubrimientos de adhesión de compuestos hidrófilos, y puede ser útil en la fabricación de revestimientos mejor aceptados en las aplicaciones biomédicas).

10 Las funciones nitrilo se modificaron a funciones ácido carboxílico en dos etapas:

➤ Una etapa ácida:



➤ Una etapa básica:



Según el tiempo de reacción, se puede tener de unos pocos % al 100 % de transformación. Estos tratamientos vienen acompañados de una considerable pérdida de espesor. Después del tratamiento ácido, la zona tratada es hidrófila. El agua moja bien la parte modificada y forma "una capa" sobre la superficie.

20 Las dos reacciones se efectúan al aire, a 100 °C (temperatura interna) en vasos de precipitados o frascos abiertos. Después de cada tratamiento, las láminas se aclaran mediante remojo de 5 minutos en agua y luego se secan bajo flujo de nitrógeno.

Las disoluciones empleadas son las siguientes:

- Disolución ácida:

21 ml de H₂SO₄ a un mínimo del 95 %

25 3,5 g de NaHSO₄: disolución a aproximadamente 37 N;

- Disolución básica:

18 g de NaOH / 25 ml H₂O: disolución a 18 N.

30 Se obtiene un tratamiento parcial remojando la lámina en el medio ácido durante un tiempo igual o inferior a 5 segundos y remojándola durante 5 a 10 segundos en el medio básico. Un tratamiento de 30 segundos en los 2 medios conduce a la total desaparición de las funciones nitrilo, lo cual corresponde a su conversión completa.

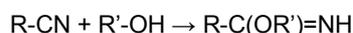
Se efectúa un análisis IRJRAS antes y después de cada etapa: lámina de oro recubierta con la película de PMAN electroinjertada antes y después de hidrólisis de los grupos nitrilo a amida (tratamiento ácido) y luego tras conversión a funciones ácido carboxílico (tratamiento básico).

En la figura 9 que se acompaña se representan los espectros IRRAS obtenidos.

35 El análisis de estos espectros revela, para el tratamiento ácido, la formación de bandas amido a 1680 cm⁻¹ (elongación C=O), y bandas de deformación de los grupos NH₂ a 1605 cm⁻¹. Tras tratamiento básico, se pone de relieve el desplazamiento de la banda carbonilo hacia 1700 cm⁻¹, lo cual corresponde a grupos ácido carboxílico, probablemente dimerizados.

Ejemplo 8: fijación de la avidina sobre una película de PMAN electroinjertada

40 En este punto se ilustra que los grupos nitrilo de una película de PMAN electroinjertada pueden ser utilizados para la fijación covalente de proteínas. Es sabido que, en efecto, los nitrilos pueden reaccionar con los alcoholes, para dar imino-éteres (síntesis de Pinner, cf.: P.L. Compagnon, M. Miocque, *Annales de Chimie*, 1970, 5, 23), según la siguiente reacción:



45 Asimismo, se conoce el mismo tipo de reacción para las aminas y los tioles. Al igual que en el citado ejemplo 6, se consigue realizar la fijación de una macromolécula de estructura tridimensional compleja, lo cual tan solo es posible

debido a la gran accesibilidad de las funciones nitrilo del polímero electroinjertado. En el ejemplo siguiente, se ilustra que esta accesibilidad es tal que permite incluso la fijación de la proteína en una conformación en la que conserva su actividad, por reacción con una molécula portadora de un fragmento biotina que tiene una afinidad muy grande para la avidina.

- 5 En un tubo equipado con un septum, se introducen 30 ml de una disolución de avidina a 2 mg/l en un tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,2. Se coloca una lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjertada tal y como se preparó anteriormente en el ejemplo 3. La lámina se deja reaccionar durante 15 horas a una temperatura de 4 °C. A continuación se saca y se aclara con agua desionizada.

En la figura 10 que se acompaña se representa el espectro IRRAS de la lámina así obtenida.

- 10 El análisis de este espectro muestra la presencia de las bandas amido I (1666 cm^{-1}) y II (1545 cm^{-1}), así como las bandas del esqueleto (1469 cm^{-1}) características de la proteína.

Ejemplo 9: comprobación de la actividad de la avidina fijada sobre una película de PMAN electroinjertada

En este ejemplo se ilustra que la avidina fijada según el protocolo del ejemplo 8 está activa, utilizándola como punto de fijación de un oligonucleótido (ODN) biotinilado. El ODN utilizado es el 15-mer siguiente:

- 15 Biotina-5'-GCTTGCTGAAGTTCG-3' (Biotina – SEC. ID. N.º 1)

En un tubo, se sumerge la lámina obtenida según el procedimiento del ejemplo 8 en una disolución de este ODN a $25\text{ }\mu\text{M}$ en un tampón PBS (pH 7,2). La lámina se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 15 horas, se saca y se aclara a chorros varias veces con agua desionizada.

- 20 La presencia del ODN se detecta por espectroscopia de fotoelectrones X (XPS). En la figura 11 que se acompaña se representan las curvas correspondientes a este análisis, así como al de una lámina recubierta con una película sencilla de PMAN electroinjertada y al de la lámina obtenida anteriormente en el ejemplo 8 (tras fijación de la avidina). La región P_{2p} muestra la presencia de los átomos de fósforo de los grupos fosfato de las bases del ODN.

- 25 Estos resultados muestran que la lámina preparada de manera acorde con el ejemplo 8 permite fijar la avidina en una conformación en la que conserva su actividad, por reacción con una molécula portadora de un fragmento biotina que tiene una afinidad muy grande para la avidina.

Ejemplo 10: fijación de anticuerpos sobre una película de PMAN electroinjertada y comprobación de su actividad

- 30 En este punto se ilustra el hecho de que se puede utilizar una película electroinjertada como recubrimiento de fijación de moléculas de estructura tridimensional compleja, y en la que la estructura es determinante en las propiedades de la molécula. La gran accesibilidad de los grupos funcionales de interés presentes en la superficie permite, en efecto, una mínima distorsión de la proteína sonda, que así puede conservar una conformación activa.

Se realiza para ello la fijación de un anticuerpo, la inmunoglobulina anti-rabbit IgG. La actividad y la especificidad de este anticuerpo se comprueban a continuación mediante reacción, por una parte, con un antígeno específico (rabbit IgG) y, por otra, con un antígeno no específico (sheep IgG).

- 35 Es de señalar que la fijación de anticuerpos abre el camino, en especial, hacia la fijación de célula a través de los polímeros electroinjertados.

Para permitir la fijación de anticuerpos a una superficie (por ejemplo, sobre el transductor de un sensor), suele ser necesario, previamente, modificar el electrodo. Por ende, se pueden crear numerosos grupos superficiales, pero que deben permitir el acoplamiento de las inmunoglobulinas, por lo que han centrado nuestra atención tres tipos de funciones: amino, alcohol, ciano.

- 40 Las funciones amino y alcohol se utilizan muchas veces para fijar anticuerpos a una superficie. Así, hay abundancia de agentes acoplantes comerciales que permiten crear enlaces covalentes entre las funciones superficiales y las de las inmunoglobulinas.

Por el contrario, la función ciano permite la fijación directa de la biomolécula. Este método es original y nunca ha sido utilizado para fijar una inmunoglobulina en una superficie, y especialmente en una superficie conductora.

- 45 Los anticuerpos contienen diferentes funciones: amino (NH_2), ácido (COOH), hidroxilo (OH) y puentes disulfuro (S-S) con posibilidad de conducir a sus anclajes sobre superficies. Las funciones amino y ácido provienen de los aminoácidos, constitutivos de los anticuerpos, y se distribuyen por toda la proteína. Por lo tanto, hay varios posibles sitios de fijación, que permiten un fácil acoplamiento, aunque no localizado, con posibilidad de conducir a una inactivación del anticuerpo (desnaturalización) frente al antígeno. Las funciones amino y ácido permiten injertar el anticuerpo entero en una superficie. Por el contrario, es necesario cortar los puentes disulfuro (S-S) y, por tanto, generar funciones tiol (SH). Entonces son los fragmentos FAB' los que se fijan. La capa de biomoléculas así
- 50

obtenida es más densa en sitios reactivos y, además, los anticuerpos quedan orientados, ya que las funciones tiol están presentes en la parte constante restante. Esta última característica es importante, ya que el anticuerpo no se fija por uno de sus sitios activos. Las inmunoglobulinas así inmovilizadas corren menos riesgo de ser desnaturalizadas e inactivadas frente a los antígenos.

- 5 Exceptuando el caso de las funciones ciano, es imprescindible utilizar un agente acoplante que permite unir de manera covalente las funciones de la superficie y del anticuerpo. En este punto se ilustra el hecho de que las películas electroinjetadas permiten a la vez asegurar una capa de recubrimiento y ofrecer grupos funcionales de interés inmediatamente disponibles para el anclaje de moléculas sonda biológicas.

10 En un tubo, se introduce una disolución de anti-rabbit IgG a 2 mg/l en tampón PBS (pH 7,2). Se sumerge en esta disolución una lámina de oro recubierta con una película de PMAN electroinjetada tal y como se preparó anteriormente en el ejemplo 3. La lámina se deja reaccionar durante 15 horas a 4 °C, y luego se saca y se aclara con chorros de agua desionizada y se seca bajo flujo de nitrógeno.

15 La lámina así tratada se sumerge nuevamente en una disolución de antígeno específico (rabbit-IgG) a 2 mg/l en tampón PBS, y se deja durante 15 horas a temperatura ambiente. A continuación se saca, se aclara con chorros de agua desionizada y se seca bajo flujo de nitrógeno.

La lámina se analiza por IRRAS antes y después del tratamiento por el anticuerpo así como después del tratamiento por el antígeno.

En la figura 12 que se acompaña se representan los espectros IRRAS así obtenidos.

20 El análisis de estos espectros revela las bandas amido I (1655 cm^{-1}) y II (1546 cm^{-1}), así como las bandas del esqueleto de la proteína a 1469 cm^{-1} .

Asimismo se observa un aumento de las bandas amido I (1655 cm^{-1}) y II (1546 cm^{-1}), y de las bandas del esqueleto de la proteína a 1469 cm^{-1} , que demuestra que ha aumentado la cantidad de proteínas fijadas a la superficie (se pone de relieve una práctica duplicación de la intensidad de estas bandas por efecto del acoplamiento con el antígeno, cuyo tamaño es aproximadamente el mismo que el del anticuerpo).

25 Este resultado es tanto más concluyente por cuanto que, cuando se trata en las mismas condiciones una lámina recubierta con anticuerpo (anti-rabbit IgG) en una disolución que contiene un antígeno no específico (sheep IgG), tan solo se observa –sobre el espectro IRRAS (no representado)– un muy escaso aumento de las bandas características anteriores (debido probablemente a absorciones no específicas).

Ejemplo 11: fijación de ADN sobre una película de PMAN electroinjetado

30 En este punto se ilustra la fijación de oligonucleótidos (ODN) sobre las funciones reactivas de un polímero electroinjetado, según una vía alternativa a la vista en el citado ejemplo 9.

Para ello, se utilizan las funciones ácido carboxílico de un polímero electroinjetado para hacerlas reaccionar con las funciones amino ODN de hebra sencilla portadora, en su extremo 5', de una función amino:

$\text{H}_2\text{N}-5'-\text{GCTTGCTGAAGTTCG}-3'$ (H_2N – SEC. ID. N. °1)

35 La fijación de esta hebra queda revelada a continuación por hibridación con la hebra complementaria no funcionalizada:

$5'-\text{CGAACGACTTCAAGC}-3'$ (SEC. ID. N. ° 2)

40 Con objeto de ilustrar en este punto la posibilidad de recurrir a brazos espaciadores, se efectúa una previa funcionalización complementaria de la película: se parte de una película de PMAN electroinjetada, sobre la cual los nitrilos son reducidos a aminos, por ejemplo como se indica en el ejemplo 3. Las aminos se hacen reaccionar con anhídrido glutárico para obtener funciones ácido carboxílico, según el siguiente protocolo: en un tubo, se introducen 30 ml de THF secado sobre tamiz molecular (4 Å), a los que se agrega 1 g de anhídrido glutárico. La lámina portadora de grupos amino se introduce en el tubo, y se deja reaccionar durante 17 horas a temperatura de 50 °C bajo atmósfera de argón y con agitación magnética (septum). A continuación se aclara la lámina con acetona, y

45 luego se seca bajo flujo de nitrógeno.

A continuación se destruyen los grupos amino residuales por amidación con el anhídrido trifluoroacético, según el siguiente protocolo: en un tubo, se introducen 30 ml de THF secado sobre tamiz molecular, y luego 1 ml de anhídrido trifluoroacético. Se introduce a continuación la lámina de la etapa anterior, la cual se deja reaccionar durante 2,5 minutos bajo atmósfera de argón con agitación magnética, a temperatura ambiente. La lámina se saca y luego se aclara mediante remojo en agua desionizada durante 5 minutos, seguidamente por chorros de agua desionizada y, finalmente, se seca bajo flujo de nitrógeno.

50

La lámina se analiza por IRRAS antes y después de cada una de las etapas; habiéndose representando los espectros así obtenidos en la figura 13 que se acompaña.

5 Antes de la reacción de amidación, el análisis IRRAS revela las bandas de elongación C=O de grupos ácido carboxílico (1700 cm^{-1}), así como las bandas amido II a 1591 cm^{-1} , abogando por una estructura al menos parcialmente funcionalizada de estructura: $R-(\text{CH}_2-\text{NH}_2)_x-(\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH})_y$, donde $y/(x+y)$ es el grado de sustitución de los grupos amino iniciales por el anhídrido glutárico, y R, el esqueleto del PMAN electroinjertado.

Tras la reacción de amidación, el análisis IRRAS confirma las bandas de elongación C=O de grupos ácido carboxílico (1700 cm^{-1}), así como las bandas amido II a 1591 cm^{-1} , y revela las bandas de elongación C-F de los grupos CF_3 (1203 cm^{-1}), abogando por una estructura funcionalizada de estructura siguiente:

10 $R-(\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CF}_3)_x-(\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH})_y$,

en la que $y/(x+y)$ es el grado de sustitución de los grupos amino iniciales por el anhídrido glutárico, y R, el esqueleto del PMAN electroinjertado.

15 A continuación, la superficie así funcionalizada se hace reaccionar con una disolución a $15\text{ }\mu\text{M}$ del ODN (15-mer) aminado en posición 5', en agua desionizada, en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) y de 1-3(dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida clorhídrico (EDC), a temperatura ambiente durante 15 horas.

La lámina se saca, se aclara con agua desionizada y se seca bajo flujo de nitrógeno, y luego se analiza por IRRAS y XPS.

20 La lámina así obtenida se hace reaccionar a continuación con una disolución de la hebra de ODN complementario de la primera hebra fijada, en agua desionizada, durante 15 horas a temperatura ambiente, se saca, se aclara con agua desionizada y luego se seca bajo flujo de nitrógeno.

En la figura 14 que se acompaña se representan los espectros IRRAS así obtenidos.

En la figura 15 que se acompaña se representan los espectros XPS.

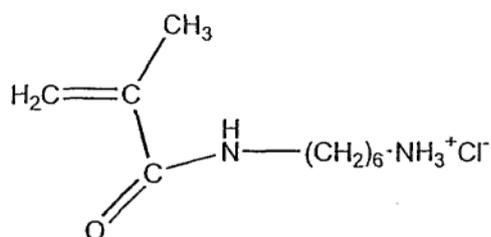
25 El análisis de los espectros IRRAS antes de la reacción con la hebra de ODN complementario de la primera hebra fijada revela la aparición de bandas amido de las bases nitrogenadas, así como bandas de elongación de los enlaces P=O de los grupos fosfato, hacia 1273 cm^{-1} .

El análisis XPS de la lámina revela la presencia de fósforo con una energía de unión característica de los grupos fosfato del ADN.

30 El análisis de los espectros IRRAS tras reacción con la hebra de ODN complementario de la primera hebra fijada confirma las bandas amido de las bases nitrogenadas, y muestra un aumento significativo de la intensidad de las bandas de elongación de los enlaces P=O de los grupos fosfato, hacia 1273 cm^{-1} . Esta observación queda confirmada por el análisis XPS.

Ejemplo 12: electroinjerto de un monómero precursor portador de un brazo espaciador

35 Se ilustra en este punto el electroinjerto de un monómero portador de un brazo espaciador que incluye 6 átomos de carbono, y portador de un grupo amino de interés (en forma de cloruro de amonio): el AminoHexil MetAcrilAmida (AHMAA) de fórmula siguiente:



40 Este ejemplo ilustra la posibilidad de realizar el electroinjerto de un monómero portador de grupos próticos, un brazo espaciador, dando lugar a un polímero electroinjertado cuyos grupos funcionales de interés son todos ellos accesibles. Estos constituyen una vía alternativa a la del ejemplo n.º 3 para obtener una película electroinjertada portadora de grupos amino. Los ejemplos 4, 5, 6 y 11, llevados a cabo de nuevo con las películas del presente ejemplo, arrojan resultados análogos.

Se realiza una película de poli-AHMAA (PAHMMA) sobre oro efectuando 20 barridos voltamétricos de $-0,5$ a $-2,3\text{ V}/(\text{Ag}^+/\text{Ag})$ a 100 mV/s sobre una superficie de oro sumergida en una disolución de $0,25\text{ mol/l}$ de AHMAA en

DMF, en presencia de $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l de TEAP. La lámina se saca de la celda electroquímica y luego se aclara vigorosamente con agua desionizada, luego con acetona y, finalmente, se seca por corriente de nitrógeno.

5 Su espectro IRRAS (no representado) es característico del polímero esperado, especialmente con las bandas características del grupo amonio a 1613, 1522 y el armónico a 2050 cm^{-1} , así como un conjunto de bandas finas entre 2400 y 2800 cm^{-1} , y la banda de elongación N-H⁺ a 3327 cm^{-1} , además de las bandas amida a 1535 y 1465 cm^{-1} .

10 La película de PAHMAA obtenida se remoja seguidamente en agitación, durante 15 minutos, en una disolución de 1 mol/l de sosa (NaOH). La lámina se aclara a continuación con agua desionizada, luego con acetona y, finalmente, se seca como anteriormente. Su espectro IRRAS (no representado) revela la completa desaparición de las bandas características de los grupos amonio y la aparición de las bandas características de los grupos amino a 2933 cm^{-1} (elongación CH₂-NH₂) y 3360 cm^{-1} (elongación N-H de una amina primaria). Este resultado demuestra la accesibilidad total de los grupos amonio que son convertidos a aminas por reacción ácido-base con la sosa.

A continuación se vuelve a remojar la lámina en una disolución de 1 mol/l de ácido clorhídrico durante 20 minutos, y luego se aclara y se seca.

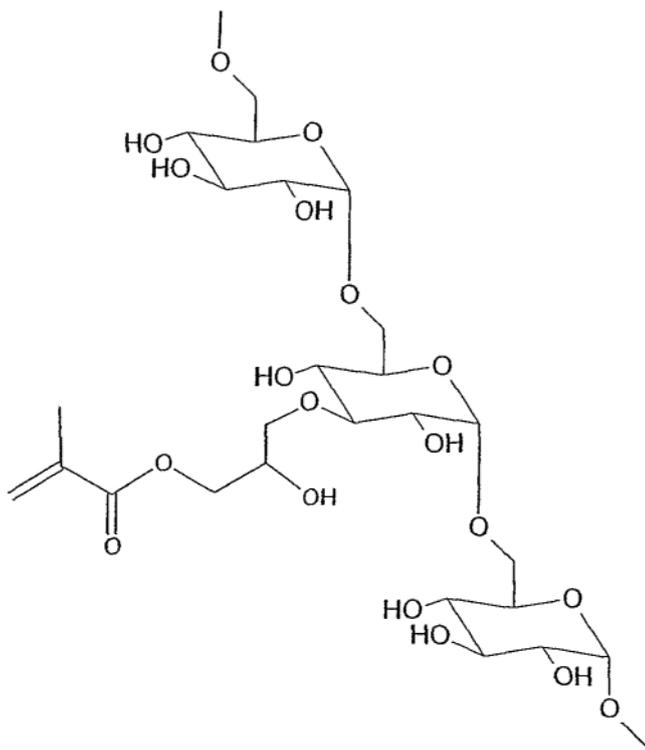
15 Su espectro IRRAS (no representado) es de todo punto idéntico al obtenido anteriormente, lo cual muestra que los propios grupos amino formados son convertidos totalmente, de nuevo, a grupos amonio.

20 Estos resultados se confirman por XPS (no representados), donde se observa claramente la presencia de cloro en el espectro global cuando la película se halla en forma de cloruro de amonio, y su ausencia cuando se halla en forma de amina. Al mismo tiempo, la región del umbral K del nitrógeno (N1s) incluye dos picos a 400 (amida) y 402 eV (amonio) cuando la película se halla en forma de amonio, y un solo pico centrado hacia 400,5 eV cuando se halla en forma de amina.

Ejemplo 13: preparación de una película de dextrano/metacrilato electroinjertada

25 El propósito de este ejemplo es demostrar que se puede realizar el electroinjerto de una macromolécula parcialmente derivatizada con grupos vinílicos activados, y disponer de los grupos funcionales no derivatizados de dicha molécula para una ulterior posfuncionalización. La macromolécula utilizada es un dextrano funcionalizado con grupos glicidilmetacrilato (GMA).

El macroelectrófilo considerado, denominado dextrano-GMA, está representado mediante la fórmula que sigue:



30 En la fórmula anterior, y en interés de la claridad, sólo se ha indicado un hidroxilo como sustituido por el GMA. En realidad, la proporción varía en función de las condiciones de síntesis.

El dextrano-GMA se obtiene a partir de un dextrano de masa $M = 15\ 000$ y de metacrilato de glicidil(2,3-epoxipropil metilpropenoato), según el protocolo descrito en W.N.E. por van Dijk-Wolthuis *et al.*, *Macromolecules*, 1995, 28, 6317.

5 El análisis del producto mediante RMN ^1H y ^{13}C (no representados) muestra que se obtiene el dextrano-GMA con un grado de sustitución del 77 %.

Se realiza una disolución, llamada disolución de dextrano-GMA, disolviendo 0,25 g del dextrano-GMA en 50 ml de DMF, en 10^{-2} mol/l de TEAP. Por lo tanto, la disolución está aproximadamente a $3,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l de dextrano-GMA.

Se preparan unas superficies de oro, que se denominan láminas de oro, pulverizando oro por efecto Joule sobre láminas de vidrio pretratadas con un velo de cromo.

10 Se realiza, de acuerdo con el procedimiento conforme a la invención, el electroinjerto del dextrano-GMA sobre una lámina de oro, utilizada como electrodo de trabajo, de un montaje de tres electrodos, en la disolución de dextrano-GMA, según el siguiente protocolo de potencial: condiciones voltamétricas con 15 barridos de $E_{\text{inicial}} = -0,6\ \text{V}/(\text{Ag}^+/\text{Ag})$ a $E_{\text{final}} = -2,8\ \text{V}/(\text{Ag}^+/\text{Ag})$ a una velocidad de $-100\ \text{mV/s}$.

15 Se obtiene, tras aclarado de la lámina con acetona y con agua, una película de 200 nm de espesor, cuyas características, comprobadas por espectrofotometría IR corresponden a las del poli(dextrano-GMA) (figura 16, en la que la curva baja representa el espectro IR de la lámina antes del aclarado y la curva alta representa el espectro IR tras aclarado).

Se observa en particular la presencia de una banda hacia $3500\ \text{cm}^{-1}$, característica de los numerosos grupos OH del dextrano electroinjertado.

20

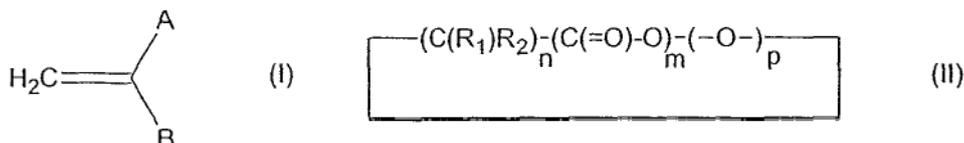
LISTA DE SECUENCIAS

- <110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
- 5 <120> SOPORTE SÓLIDO QUE INCLUYE UNA SUPERFICIE CONDUCTORA O SEMICONDUCTORA DE LA ELECTRICIDAD FUNCIONALIZADA, SU PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y SUS UTILIZACIONES
- <130> F263 CAS 80 PCT
- 10 <150> FR 02/08381
<151> 04-07-2002
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL: OLIGONUCLEOTIDO
- 20 <400> 1
gcttgctgaa gttcg 15
- 25 <210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> SECUENCIA ARTIFICIAL: OLIGONUCLEOTIDO
- 30 <400> 2
cgaacgact caagc 15

REIVINDICACIONES

1. Soporte sólido que incluye al menos una región conductora y/o semiconductora de la electricidad con óxido reducible en su superficie, caracterizado por el hecho de que al menos una zona de dicha superficie está funcionalizada con una película orgánica electroinjetada obtenida a partir de precursores orgánicos electroactivos que incluyen cada uno de ellos al menos un grupo funcional de interés, seleccionándose dichos precursores orgánicos de entre los monómeros vinílicos o cíclicos portadores de grupos próticos, eventualmente en mezcla con precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés, y por el hecho de que el número de grupos funcionales de interés accesibles para la formación de un enlace covalente, iónico o de hidrógeno con un grupo complementario en el seno de dicha película representa al menos el 90 % del número total de los grupos orgánicos funcionales de interés.

2. Soporte según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dichos precursores orgánicos se seleccionan de entre los monómeros vinílicos activados y las moléculas escindibles por ataque nucleofílico, que responden respectivamente a las fórmulas (I) y (II) siguientes:



en las cuales:

- A, B, R₁ y R₂, iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un radical alquilo C₁-C₄, un radical nitrilo o una función orgánica seleccionada de entre las funciones hidroxilo, amino: -NH_x con x = 1 ó 3, tiol, ácido carboxílico, éster, amida: -C(=O)NH_y en la que y = 1 ó 2, imida, imidoéster, aromático, halogenuro de ácido: -C(=O)X en la que X representa un átomo de halógeno seleccionado de entre el flúor, el cloro y el bromo, anhídrido de ácido: -C(=O)OC(=O), nitrilo, succinimida, ftalimida, isocianato, epóxido, siloxano: -Si(OH)_z en la que z es un número entero comprendido entre 1 y 3, ambos inclusive, benzoquinona, carbonilo-diimidazola, para-tolueno sulfonilo, para-nitrofenil cloroformiato, etilénico y vinílico o un grupo orgánico (o brazo espaciador) portador de al menos una de las funciones anteriormente enumeradas; entendiéndose que uno al menos de A y B y que uno al menos de R₁ y R₂ representa una de dichas funciones orgánicas o un grupo orgánico portador de al menos una de dichas funciones;
- n, m y p, iguales o diferentes, son números enteros comprendidos entre 0 y 20, ambos inclusive.

3. Soporte según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que los monómeros vinílicos activados de fórmula (I) se seleccionan de entre el hidroxietilmetacrilato, el acrilato y el metacrilato de glicidilo, el ácido acrílico, el ácido metacrílico, el aminopropil metacrilamida y el aminohekil metacrilamida.

4. Soporte según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que las moléculas escindibles por ataque nucleofílico de fórmula (II) son óxidos de etileno sustituidos.

5. Soporte según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que la superficie conductora o semiconductora de la electricidad es una superficie de acero inoxidable, de acero, de hierro, de cobre, de níquel, de cobalto, de niobio, de aluminio, de plata, de titanio, de silicio, de nitruro de titanio, de nitruro de tungsteno, de nitruro de tantalio o una superficie metálica noble seleccionada de las superficies de oro, de platino, de iridio o de platino iridiado.

6. Soporte según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que la densidad de los grupos funcionales de interés accesibles está comprendida preferentemente entre 10⁴/μm² y 10¹⁰/μm².

7. Procedimiento de preparación de un soporte tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de consistir en realizar, en una sola etapa, el electroinjerto de precursores orgánicos electroactivos sobre al menos una zona de al menos una región conductora y/o semiconductora de la electricidad con óxido reducible en su superficie de un soporte sólido, por electrólisis en medio orgánico, de una composición que encierra, en dicho medio orgánico, al menos un precursor orgánico electroactivo que incluye al menos un grupo funcional de interés, mediante puesta en contacto de dicha composición con dicha zona, sometándose esta última a un protocolo de potencial en cuyo transcurso es llevada, durante la totalidad o parte del protocolo de potencial, a un potencial superior o igual a un potencial eléctrico umbral determinado con respecto a un electrodo de referencia, siendo dicho potencial eléctrico umbral el potencial rebasando el cual se produce el injerto de dichos precursores, y por el hecho de que se obtiene un grado de accesibilidad en grupos funcionales de interés de al menos el 90 % (en número):

- a) ajustando el protocolo de potencial al objeto de conllevar un grado de injerto inferior o igual al 60 %, y/o

- b) mediante la utilización de una composición en la que los precursores orgánicos electroactivos funcionalizados están presentes en mezcla con precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés, representando entonces estos últimos del 0,1% al 95 % del número total de precursores presentes en el seno de dicha composición, y/o
- 5 c) mediante la utilización de precursores orgánicos electroactivos seleccionados de entre aquellos en los cuales el grupo funcional de interés es llevado en el extremo de un brazo espaciador.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que el grado de injerto se ajusta a un valor comprendido entre el 10 y el 40 %.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por el hecho de que, según la variante b), los
10 precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés representan del 0,1 al 50 % del número total de precursores presentes en el seno de dicha composición.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por el hecho de que la concentración de precursores orgánicos electroactivos que no incluyen un grupo funcional de interés está comprendida entre 0,1 y 10 mol/l.
- 15 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por el hecho de que la concentración de precursores orgánicos electroactivos que no incluyen grupos funcionales de interés en el seno de dicha composición orgánica está comprendida entre 10^{-3} y 18 mol/l.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, caracterizado por el hecho de que la electrólisis se realiza en condiciones voltamétricas.
- 20 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizado por el hecho de que el medio orgánico se selecciona de entre la dimetilformamida, el acetato de etilo, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizado por el hecho de que el medio orgánico encierra además al menos un electrolito soporte.
- 25 15. Utilización de un soporte sólido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en calidad de recubrimiento de adhesión para la fijación de moléculas de interés o de objetos portadores de una función complementaria.
16. Utilización según la reivindicación 15, caracterizada por el hecho de que las moléculas de interés son proteínas y de que dicho soporte es utilizado entonces como superficie bioactiva o como chip de proteínas.
- 30 17. Utilización según la reivindicación 15, caracterizada por el hecho de que las moléculas de interés son moléculas de ácido nucleico y de que dicho soporte es utilizado entonces como superficie bioactiva o como chip de ácido nucleico.
18. Utilización según la reivindicación 15, caracterizada por el hecho de que las moléculas de interés o los objetos portadores de una función complementaria se seleccionan de entre los polímeros biocompatibles y de que dicho soporte es utilizado entonces como superficie biocompatible o como superficie con propiedades
35 encapsulantes.
19. Utilización de un soporte sólido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para realizar el pegado de objetos sobre superficies conductoras o semiconductoras mediante reacciones químicas de superficie.

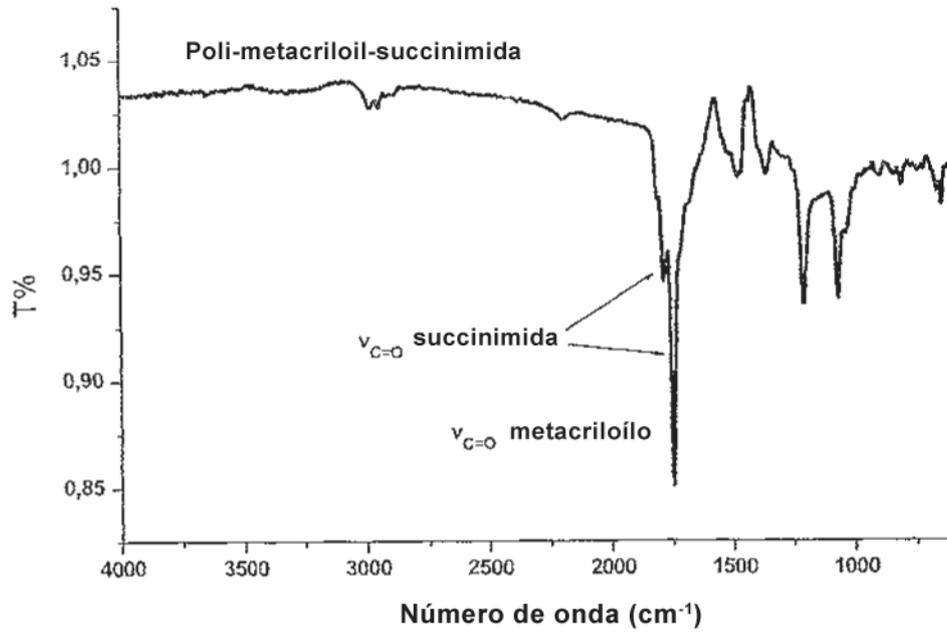


Figura 1

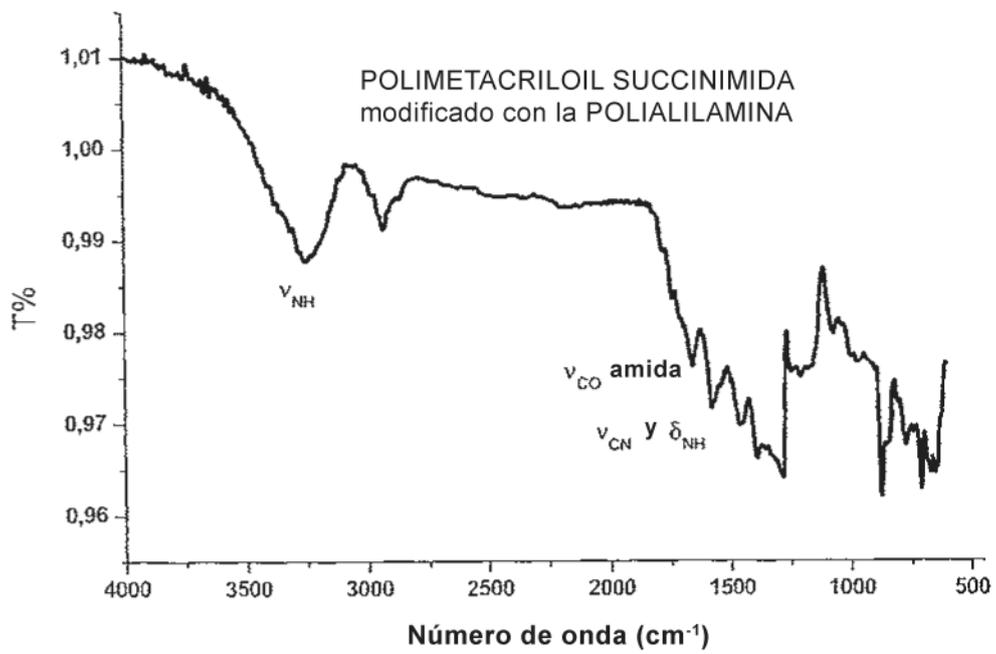


Figura 2

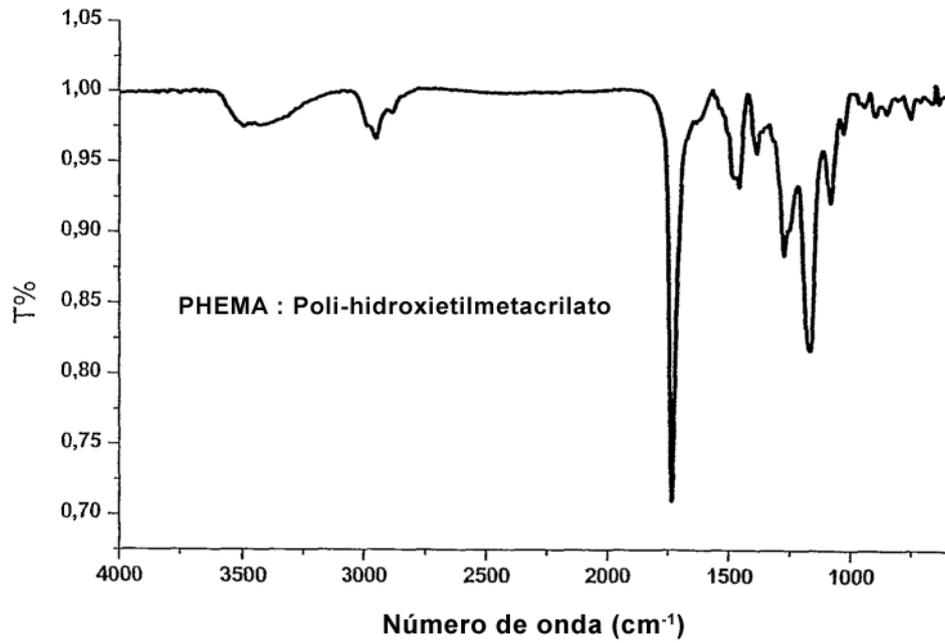


Figura 3

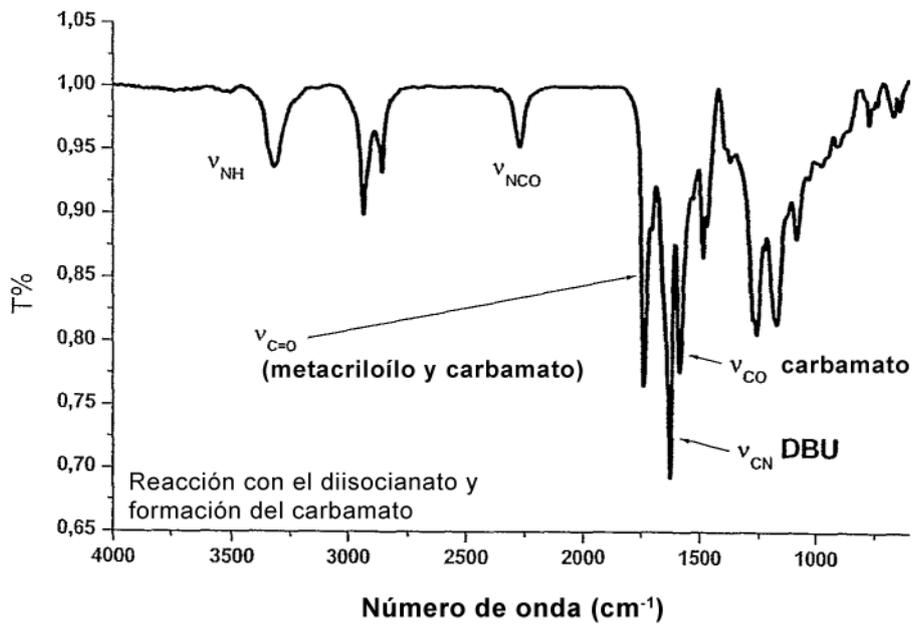


Figura 4

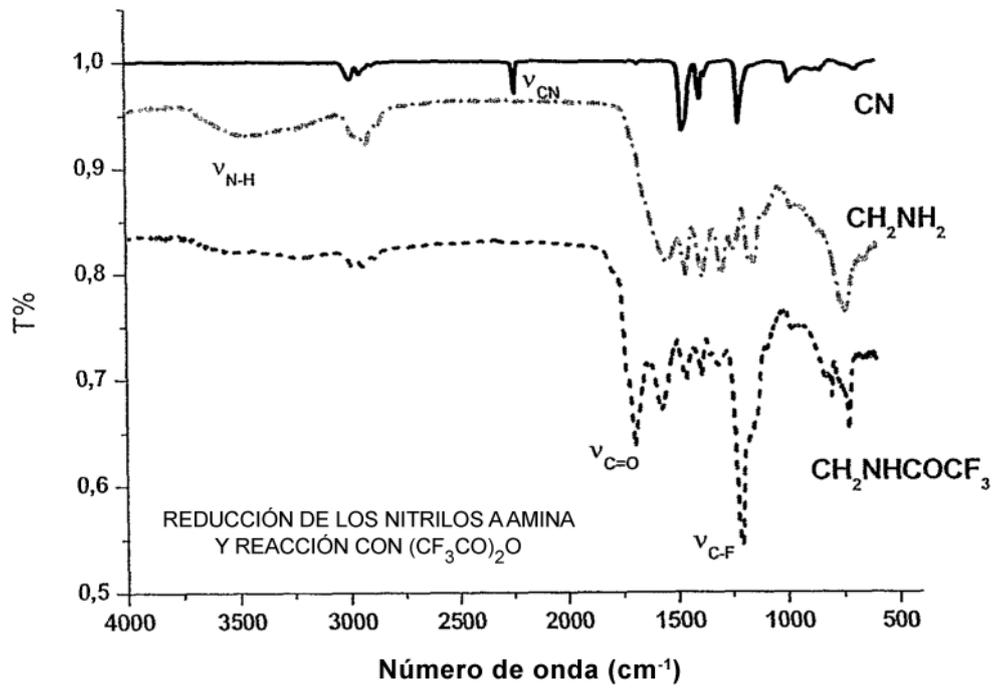


Figura 5

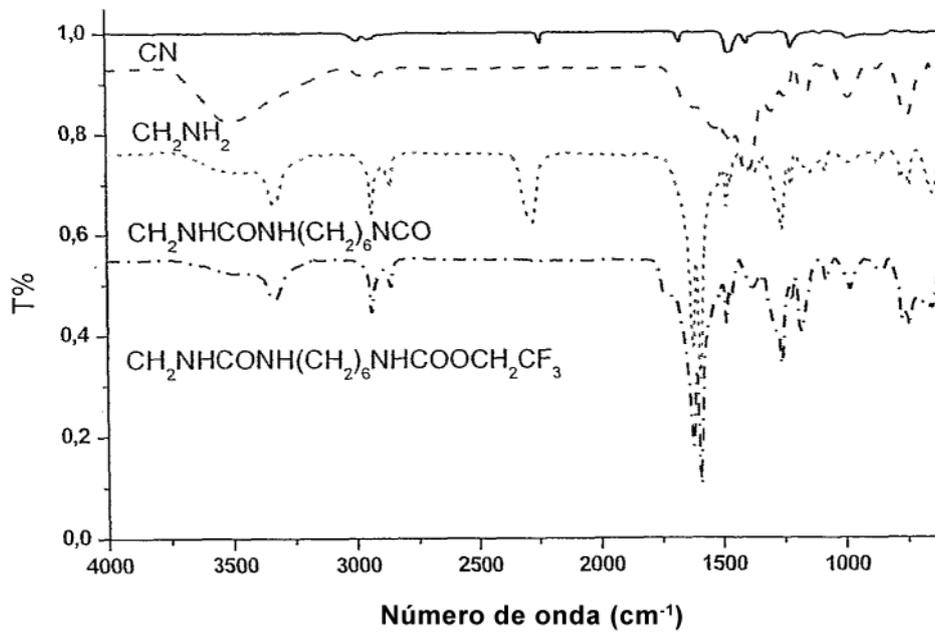


Figure 6

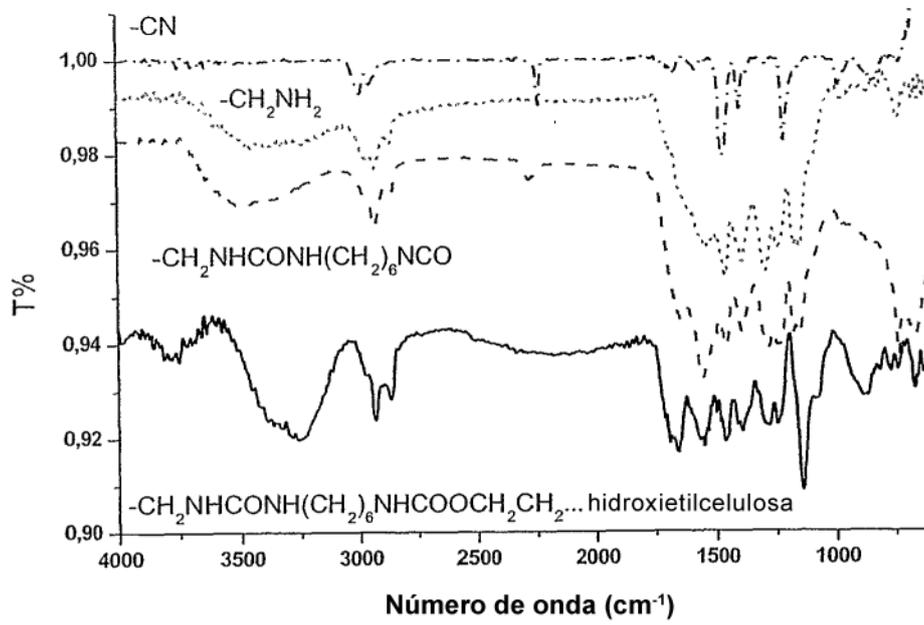


Figura 7

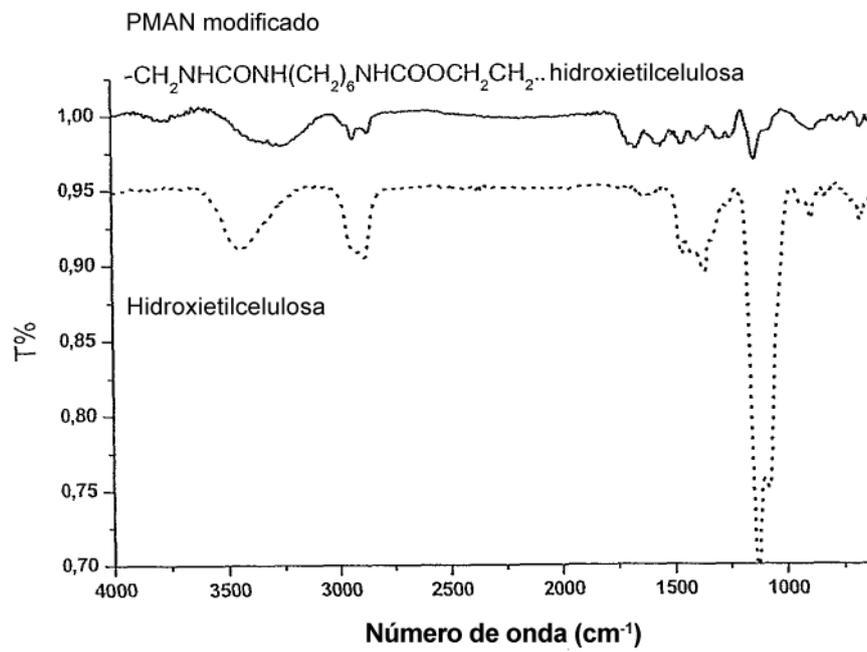


Figura 8

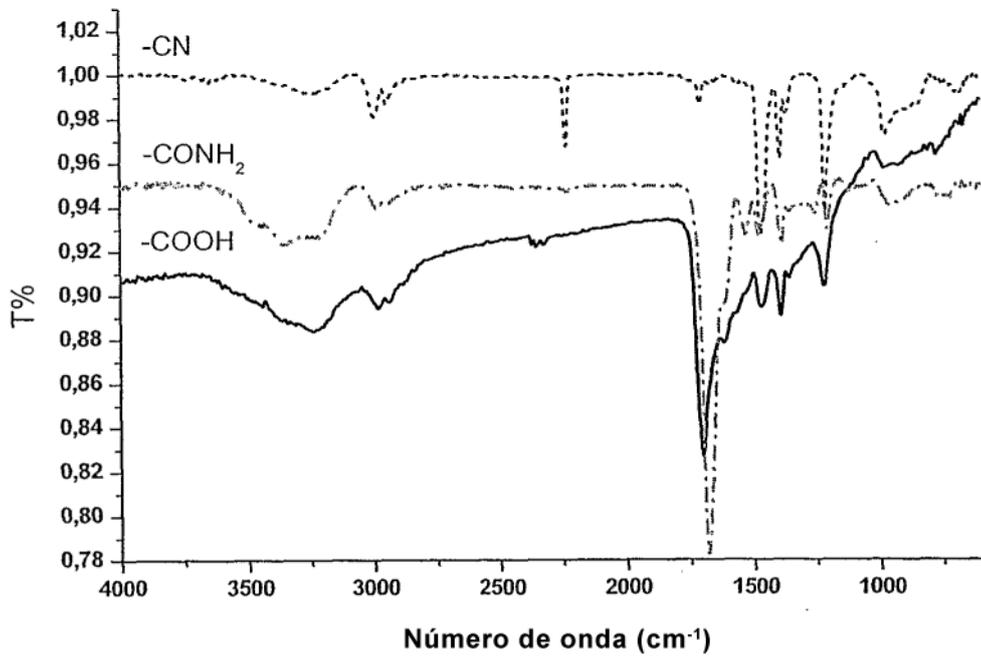


Figura 9

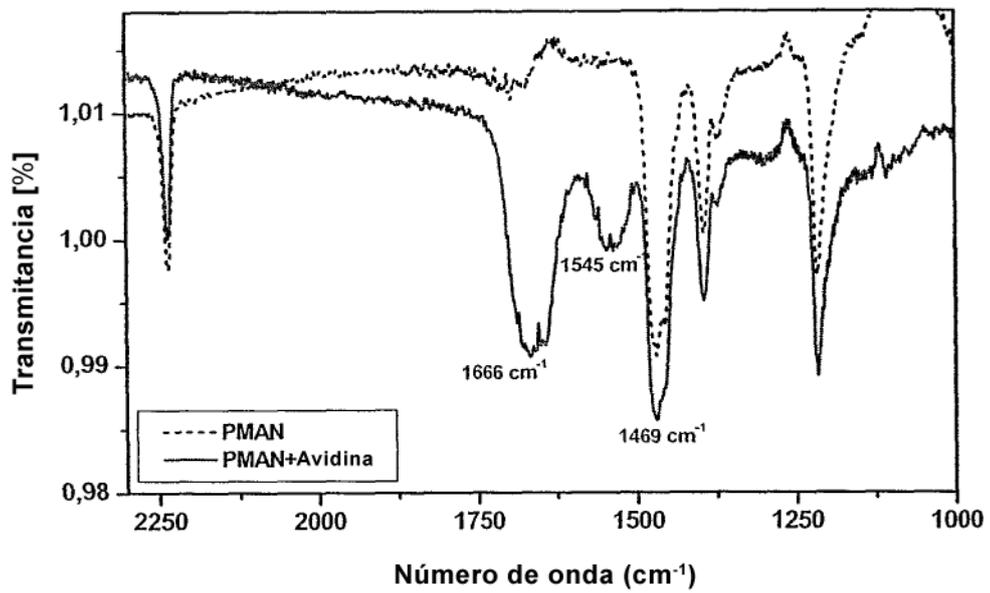


Figura 10

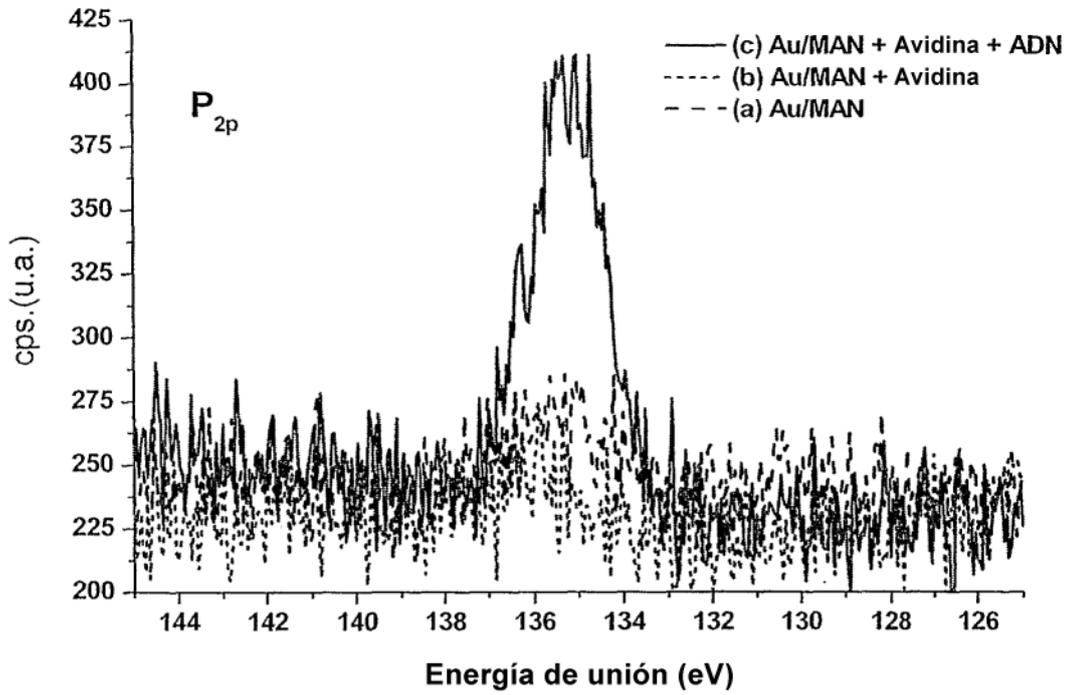


Figura 11

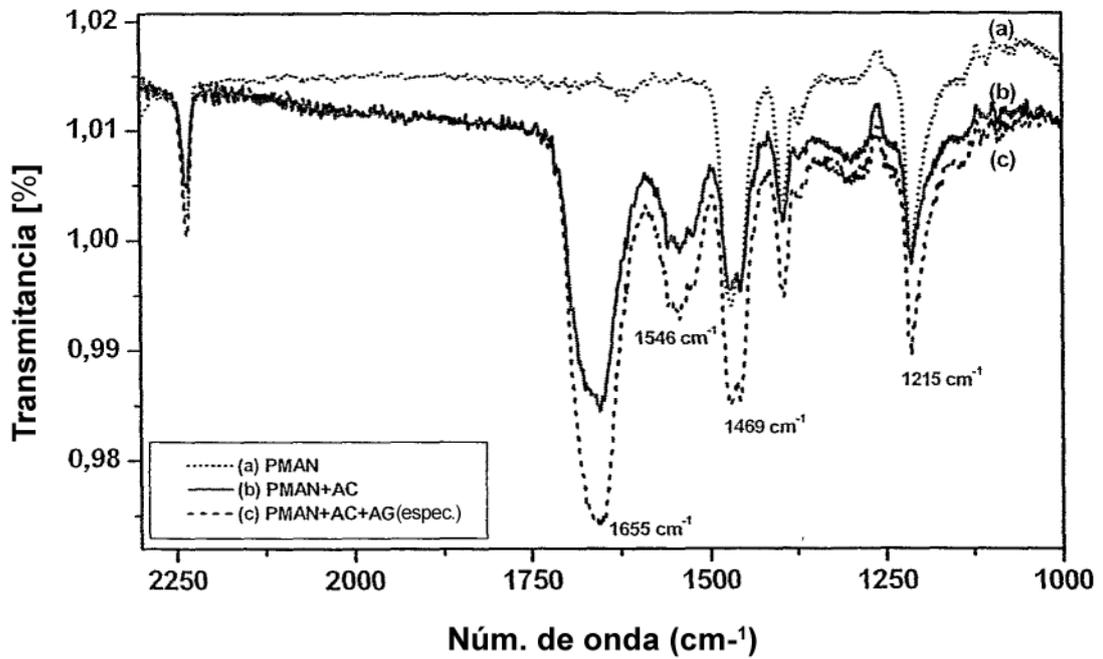


Figura 12

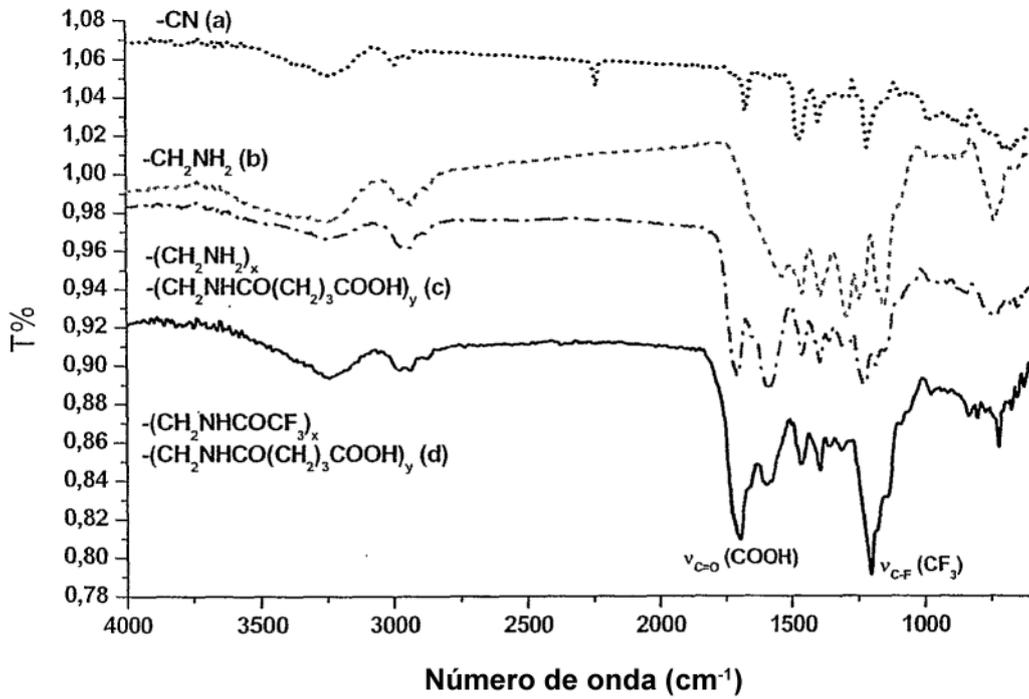


Figura 13

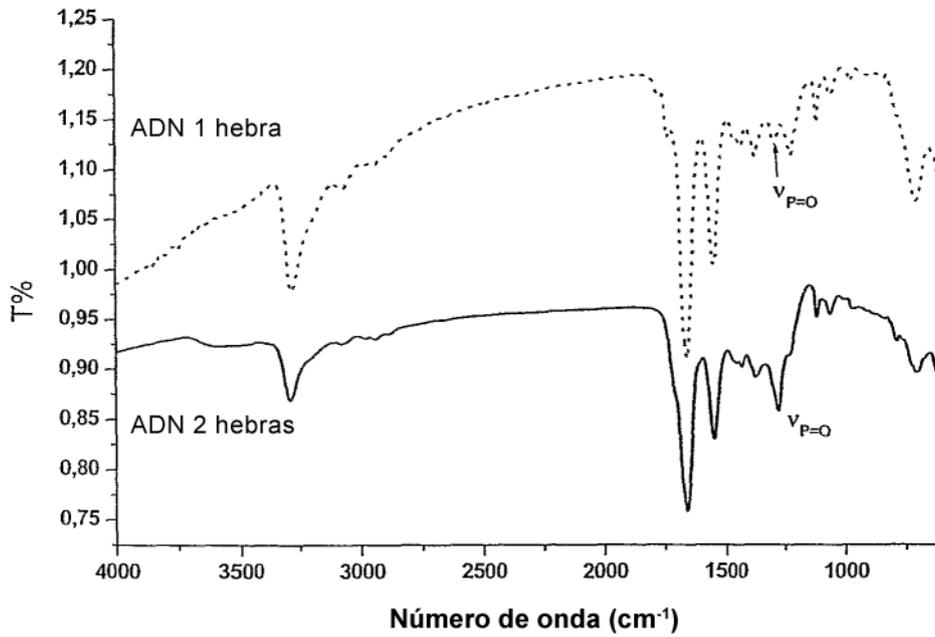


Figura 14

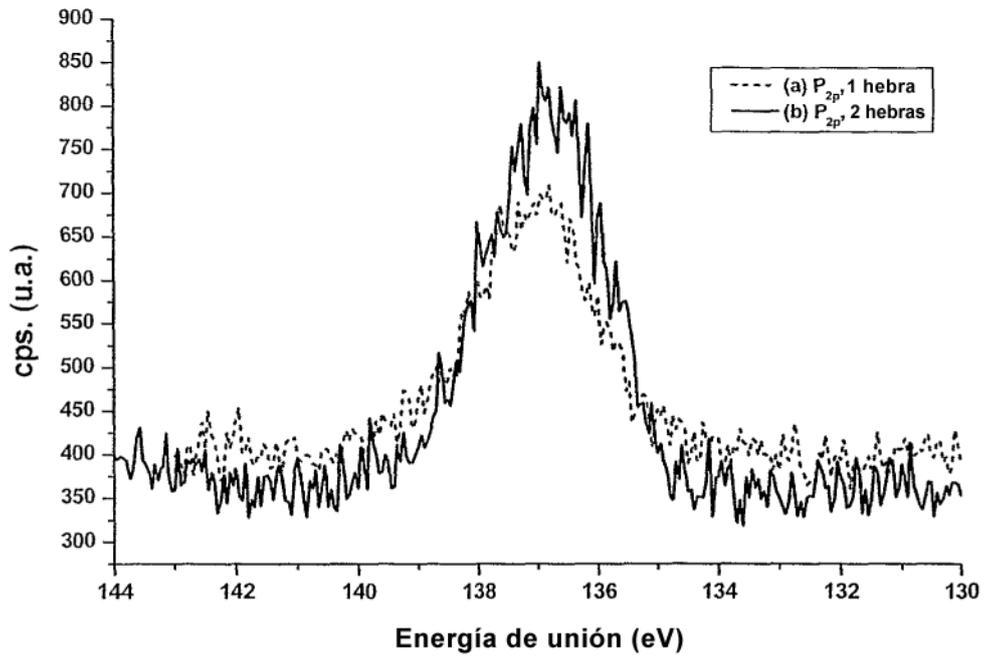


Figura 15

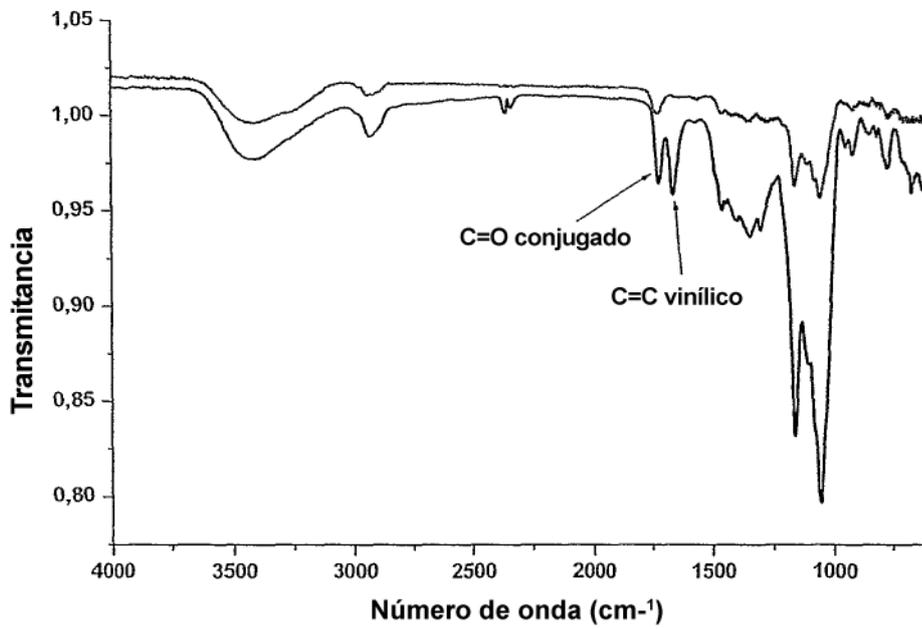


Figura 16