

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 473**

21 Número de solicitud: 202030068

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.07.2021

Fecha de concesión:

28.04.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.05.2022

73 Titular/es:

ACCIONA ENERGÍA, S.A. (100.0%)
Avda. Ciudad de la Innovación, nº 5
31621 Sarriguren (Navarra) ES

72 Inventor/es:

REYES GARCIA, Mari Luz;
BASAIL IZCUE, Pedro Miguel;
DIAZ-ALEJO GUERRERO, Héctor Miguel;
MARTÍNEZ - ALESÓN GARCÍA, Paloma María y
MARTÍNEZ ESTEBAN, Paloma

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Biosensor microalgal para la detección de HTF**

57 Resumen:

Biosensor microalgal para la detección de HTF.
Biosensor para la detección de HTF que comprende un biodetector formado una población de microalgas y un sistema de transducción de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas. La disminución en la fluorescencia emitida por las microalgas en presencia de una muestra indicaría la presencia de HTF en la misma. En función de los valores de fluorescencia obtenidos es posible cuantificar la cantidad de HTF existente en la muestra. La invención también se refiere, por tanto, al uso del biosensor y al método para la detección de HTF.

ES 2 846 473 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Biosensor microalgal para la detección de HTF

5 La presente invención se refiere a un biosensor microalgal, así como a su uso para la
detección de HTF (fluido térmico caloportador, del inglés, *heat transfer fluid*), que es una
mezcla de dos hidrocarburos aromáticos derivados del benceno: difenilo y éter difenílico.
Por tanto, la presente invención se encuadra dentro del sector del Medio Ambiente,
siendo especialmente útil en las Plantas Termosolares que utilizan HTF como fluido
10 caloportador.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la actualidad existen numerosos dispositivos para la medición de diferentes
15 parámetros físico-químicos en agua, pero muy pocos pueden ser considerados como
sistemas integrados que monitorizan de manera remota, continua y autónoma los
parámetros de calidad de un cuerpo de agua. En concreto, existen numerosos productos
comerciales de transductores convencionales para la medida de parámetros como
temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, turbidez, nutrientes, etc. Sin embargo, no
20 existe ningún transductor convencional capaz de realizar una estimación sensible y
específica de HTF.

Las tecnologías más tradicionales incluyen la espectrofotometría o la cromatografía
liquida y de gases entre otras, para medir la concentración de los componentes del HTF.
25 Este tipo de análisis, aunque pueden alcanzar especificidad y sensibilidad elevadas, son
técnicas que demandan tiempos largos de análisis y el empleo de reactivos.

Los sensores Micro Electro Mecánicos (MEMs) están revolucionando el mercado con
dispositivos que en un tamaño inferior a 20 mm son capaces de incorporar
30 acelerómetros, giroscopios, magnetómetros, barómetros o higrómetros con una
robustez y precisión que supera a la de los instrumentos convencionales. Compañías
como BOSCH o los comercializan a precios muy bajos por su amplio uso en plataformas
autónomas como la telefonía digital y los mandos de videojuego. Sin embargo, la batería
de sensores disponibles es aún muy baja y está fundamentalmente limitada a sensores
35 inerciales sin incorporar aún la recepción de contaminantes concretos.

Los LabOn Chip (LOC) constituyen una tecnología conectada con los MEMs y es novedosa para el análisis de volúmenes de fluidos extremadamente pequeños. Sin embargo, su estado de madurez tecnológica aún no es suficiente.

5 Los transistores de efecto de campo (FET's), los dispositivos ion-selectivos (ISFETs) o los sensores químicos que miden la energía de reacción con moléculas simple (CHEMFET) son sensores tipo chip similares a los usados en los ordenadores excepto que la puerta metálica que controla la corriente del transistor se reemplaza por un material orgánico o biológico. El material sensible responde a un cambio en el medio
10 circundante, bien sea gaseoso o líquido y la respuesta ejerce un efecto de campo sobre la corriente de fuente a sumidero en el FET. A pesar de su potencialidad, incluso para actuar como un biosensor, la encapsulación se ha convertido en una dificultad crucial mientras que las propiedades de conducción de la superficie del sensor se han demostrado que son difíciles de superar (Vat Dam, W. Olthuis; A van Den Berg, (2007)
15 *Analyst*, 132, 365–370).

Las técnicas basadas en sonidos y ultrasonidos, al igual que las de microondas, utilizan los cambios en la propagación de ondas a través de diferentes medios como elemento de detección de compuestos en medios sólidos, líquidos y acuosos. Aunque se aplican
20 en entornos industriales, su implementación a la determinación de contaminantes orgánicos en agua parece contar con grandes dificultades de operatividad y especificidad (Franco et al. (2012) *Dyna*, 176: 4-9).

Otras técnicas como la visión por computador o las imágenes hiperespectrales, aunque
25 útiles para construir mapas de distribución de contaminantes como los hidrocarburos en masas de agua, no han demostrado aún su validez para realizar determinaciones precisas y sensibles de contaminantes concretos.

Asimismo, se han utilizado biosensores para la identificación de compuestos o
30 contaminantes. Un biosensor es un dispositivo analítico que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas, permitiendo así la medición de parámetros biológicos o químicos. Está constituido por un receptor biológico, que detecta específicamente una sustancia mediante interacciones biomoleculares, y un transductor, que interpreta la reacción de reconocimiento biológico que produce el
35 receptor traduciéndola en una señal cuantificable. Los elementos biológicos receptores

pueden ser enzimas, anticuerpos, proteínas, secuencias de oligonucleótidos, fragmentos subcelulares, secciones de tejidos animales y vegetales, o células completas entre las que se encuentran bacterias o algas. Por su parte, como transductores se emplean dispositivos ópticos, electroquímicos, mecano-acústicos, etc.

5 Este contacto íntimo entre material biológico y electrónica permite utilizar una respuesta de naturaleza biológica ante un compuesto determinado para generar un sensor que funciona como un transductor convencional, capaz de operar en continuo generando datos exactos y reproducibles sin intervención humana (Brayner et al. (2011) *Anal.Bioanal. Chem.* 401, 581–597).

10 Se han utilizado biosensores, por ejemplo, en la detección de compuestos organofosforados (WO 2009/013370 A1), así como biosensores microalgales específicos para herbicidas (ej. Marvá et al., 2010. *Aquatic Toxicology* 96: 130-134) o plaguicidas (ej. González et al., (2012).. *Aquatic Toxicology* 109: 25-32).

15 Sin embargo, no se conoce hasta la fecha un biosensor como el de la presente invención, basado en microalgas, que permita la detección de HTF en una muestra.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un biosensor para la detección de HTF caracterizado por comprender:

- un biodetector que comprende una población de microalgas y
 - un transductor de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la
- 25 población de microalgas.

Por microalga, según se usa en el contexto de la presente invención, se entiende un alga microscópica (preferiblemente de entre 2 y 200 μm), unicelular, eucariota y fotoautótrofa.

30 El biosensor microalgal objeto de la presente invención aprovecha el hecho de que las microalgas contienen clorofila como pigmento fotosintético, lo que permite usar la fluorescencia de ésta como base para la medida de la actividad biológica celular de las microalgas. La población de microalgas debe recibir luz, bien sea natural (luz solar) o

35 artificial, para realizar la fotosíntesis.

Por biosensor, según se usa en la presente invención, se entiende una herramienta o sistema analítico compuesto por un material biológico inmovilizado (enzima, anticuerpo, célula entera, orgánulo o combinaciones de los mismos), acoplado a un sistema transductor adecuado que convertirá la señal biológica en una señal cuantificable.

5

El biodetector (población de microalgas) se encuentra integrado en el sistema de transducción o transductor.

En una forma de realización, la población de microalgas se dispone en una cubeta o pocillo integrado en el equipo transductor de señal.

10

En particular, en la presente invención, el transductor transforma una señal de fluorescencia en una señal eléctrica.

En una realización preferida, el transductor de señal es un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.

15

El estado de la actividad fotosintética de las algas verdes puede monitorizarse mediante la intensidad de la fluorescencia. Ello se debe a que luz solar es absorbida por una red de pigmentos unidos a proteínas (fotosistemas I y II). Una pequeña parte de la energía absorbida se disipa en forma de calor; mientras que otra parte se emite como fluorescencia. Es ésta la medida que se realiza con el fluorímetro. Si el alga está en presencia de un tóxico (contaminante) su actividad fotosintética se ve afectada y la medida de la fluorescencia cambia.

20

25

En una realización preferida, la población de microalgas comprende o consiste en la microalga *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) depositada en el Banco Nacional de Algas con nº de depósito BNA D32-09. Esta microalga fue depositada bajo el Tratado de Budapest en el Banco Nacional de Algas (BNA), Centro de Biotecnología Marina, Universidad de la Palmas de GC, C/ Muelle de Taliarte s/n; 35214 Telde -Las Palmas (España), el 25 de marzo de 2009 y le correspondió el nº de depósito BNA D32-09.

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del biosensor descrito en el primer aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra.

35

Como es conocido para el experto en la materia, el fluido térmico caloportador HTF es una mezcla de dos hidrocarburos: difenilo y éter difenílico. De forma más concreta, HTF se refiere a una mezcla eutéctica de bifenilo (26,5 %) y óxido de difenilo (73,5 %). Este fluido es ampliamente utilizado en centrales termosolares.

El biosensor de la invención permite obtener datos cuantificables en tiempo real, con elevada especificidad y reproducibilidad. Puede utilizarse para la medida de HTF *in situ* y/o en continuo. Además, presenta gran versatilidad al poder utilizarse para medir HTF en aire, en agua y en suelo. En este último caso realizando un proceso previo de extracción, que se realizaría preferiblemente mediante sonicación en medio acuoso, sin uso de disolventes orgánicos

El biosensor presenta una gran relevancia para la detección de HTF en centrales termosolares, no sólo en el agua, sino que puede aplicarse también, con la incorporación de sencillos sistemas de muestreo, para determinar la concentración a la que están expuestos los trabajadores en el ambiente laboral (detección en aire). Igualmente, incorporando una etapa de extracción, es posible aplicar el biosensor para evaluar la posible presencia de HTF en suelos tras derrames. En el caso de muestras de aire, es necesario muestrear durante un tiempo definido en el aire, lo cual se realiza exponiendo un muestreador de aire que lleva un filtro en el que queda retenido el HTF que pueda haber en el aire.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra, mediante el biosensor descrito en el primer aspecto de la invención, que comprende las etapas de:

- a) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas mediante el transductor de señal,
- b) contactar la muestra a analizar con la población de microalgas,
- c) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas en contacto con la muestra,
- d) determinar los cambios de fluorescencia entre la medida de la etapa a) y la c) , de manera que la disminución en la fluorescencia implicaría la existencia de HTF.

35

A fin de cuantificar la cantidad de HTF, se llevaría a cabo una etapa adicional e) que comprendería correlacionar dichos cambios de fluorescencia con la concentración de HTF en la muestra, para lo cual se realizaría previamente una recta de calibrado con medidas de fluorescencia de muestras de concentración conocida de HTF.

5

En el caso de que la muestra sea sólida (suelo) o gaseosa (aire), habría que realizar una etapa a'), antes de la etapa b), a fin de extraer el HTF de la muestra sólida o gaseosa en agua.

10

Este método, por tanto, se basa en la medida de los cambios en la fluorescencia que se hayan podido dar debido a la presencia de HTF. El HTF produce una inhibición en la fotosíntesis de las microalgas, lo que da lugar a una menor fluorescencia de las mismas cuando están expuestas a dicho fluido térmico. Esta variación (inhibición) de la fluorescencia se relaciona con la concentración de HTF en la muestra.

15

Para medir el HTF en una muestra, el biosensor se puede utilizar *in situ* en el mismo lugar donde se encuentre la muestra a analizar, ya sea en un entorno cerrado en el ambiente exterior. Para hacer la medida *in situ* y/o en continuo, el biosensor se puede acoplar a un equipo de bombeo que hace pasar la muestra (en estado líquido) a los pocillos donde se encuentre la población de microalgas. El sistema de bombeo se puede programar electrónicamente, bien de forma remota o *in situ*, para que se active de forma automática y con la periodicidad que se establezca.

20

Por tanto, otro objeto de la presente invención es un sistema para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra líquida *in situ* que comprende el biosensor de la presente invención y un equipo de bombeo configurado para enviar la muestra líquida a analizar desde su situación original hasta el biosensor a fin de ponerla en contacto con la población de microalgas.

25

30

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

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **FIG. 1:** Esquema del biosensor de la presente invención.

FIG. 2: Recta de calibrado (% inhibición de fluorescencia frente a concentración de HTF en la muestra) obtenida en el ejemplo 1 de la presente invención.

10 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante un ejemplo realizado por los inventores.

15 Ejemplo 1: Preparación del biosensor y medida de HTF en muestra de agua

En primer lugar, se preparó un cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) (BNA D32_09) que constituye la base de la detección. Para ello, se tomó un inóculo de la especie *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) con número de depósito BNA D32-09, depositada en el
20 Banco Nacional de Algas y se cultivó en medio BG-11 (Sigma-Aldrich).

A fin de hacer las mediciones, se colocaron 1,5 ml de medio de cultivo (BG-11) con una pipeta pasteur de plástico de un solo uso en una celdilla integrada en el fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (Toxy-Pam. Waltz). Este medio de cultivo dota a las algas de las condiciones idóneas para hacer una comparación correcta respecto a la muestra problema y servirá como blanco en la medida. Después se tapó la cubeta correctamente con un tapón negro para evitar la entrada de luz del medio ambiente exterior a la cubeta. Posteriormente se realizó la medida de fluorescencia. Dicha medida correspondió al blanco.
30

Después se destapó la cubeta y se añadieron 100 µl del cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) (BNA D32-09) con una micropipeta automática. Este cultivo estuvo al menos 2 horas antes en completa oscuridad. Se tapó la cubeta con el tapón negro y se realizó la medida de fluorescencia. El biosensor realizó tres medidas, una cada 30
35 segundos. Se hizo la media de las tres medidas y se calculó la desviación estándar.

Estas medidas se realizaron como control para después comparar el resultado con la muestra de interés.

- 5 Para hacer la medida con la muestra real a analizar (en este caso, se preparó una muestra de agua contaminada con HTF para hacer el ensayo, que será la muestra a analizar) se añadieron 1,5 ml de dicha muestra. Se tapó la cubeta con el tapón negro. Se destapó y se añadieron 100 µl de cultivo de algas con ayuda de una micropipeta automática. Mezclar tres veces para conseguir de esta manera una mezcla homogénea.
- 10 Y se realizaron las medidas de fluorescencia de la muestra problema.

Una vez hechas las medidas del control y de la muestra problema, el fluorímetro que mide las variaciones en la fluorescencia permitió obtener los datos del % inhibición de la capacidad fotosintética del cultivo al estar en contacto con el tóxico (HTF). El % inhibición tendrá un valor de 0 a 100, indicando que el alga está en correctas condiciones cerca del 0 y que ha muerto a causa del tóxico cercano al 100. En el caso de la muestra a analizar se obtuvo un valor de inhibición del 55%.

15

20 Para saber la concentración exacta de HTF en la muestra se realizó una recta de calibrado con medidas de muestras con concentración de HTF conocida, que en el caso del HTF y la microalga usada dio el resultado de la figura 2. En el caso de la muestra a analizar se obtuvo un valor de inhibición del 55%, que corresponde a una concentración de HTF de 90.000 microgramos/l.

25

REIVINDICACIONES

1. Biosensor para la detección de HTF caracterizado por comprender:
5 - un biodetector que comprende una población de microalgas y
 - un transductor de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas.

2. Biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 donde el transductor de señal es un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.
10

3. Biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde la población de microalgas comprende o consiste en la especie *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) depositada en el Banco Nacional de Algas con nº de depósito BNA D32-09.

- 15 4. Sistema para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra líquida que comprende el biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un equipo de bombeo configurado para enviar la muestra líquida a analizar desde su situación original hasta el biosensor a fin de ponerla en contacto con la población de microalgas.

- 20 5. Uso del biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra.

- 25 6. Uso según reivindicación 5 donde la muestra es una muestra de agua, de aire o de suelo.

7. Uso según reivindicación 5 para detectar HTF en una muestra de agua en continuo y/o *in situ*.

- 30 8. Método para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra, mediante el biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:
a) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas mediante el transductor de señal,
35 b) contactar la muestra a analizar con la población de microalgas,
 c) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas en contacto con la muestra,

d) determinar los cambios de fluorescencia entre la medida de la etapa a) y la etapa.

5 9. Método, según reivindicación 8, donde la muestra a analizar es es una muestra de agua, de aire o de suelo.

10. Método, según reivindicación 8, donde las etapas a) a d) se realizan en continuo y/o *in situ*.

10 11. Método, según reivindicación 8, donde, a fin de cuantificar la cantidad de HTF, se llevaría a cabo una etapa adicional e) que comprendería correlacionar dichos cambios de fluorescencia con la concentración de HTF en la muestra mediante una recta de calibrado realizada con medidas de fluorescencia de muestras de concentración conocida de HTF.

15

12. Método, según reivindicación cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 11, donde se realiza una etapa adicional a'), antes de la etapa b), en caso de que la muestra proceda del suelo o del aire y donde dicha etapa a') comprende la extracción el HTF de la muestra sólida o gaseosa en agua.

20

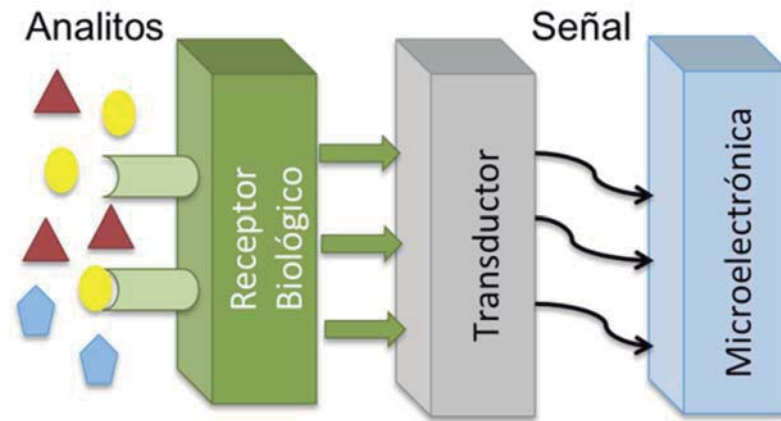


FIG. 1

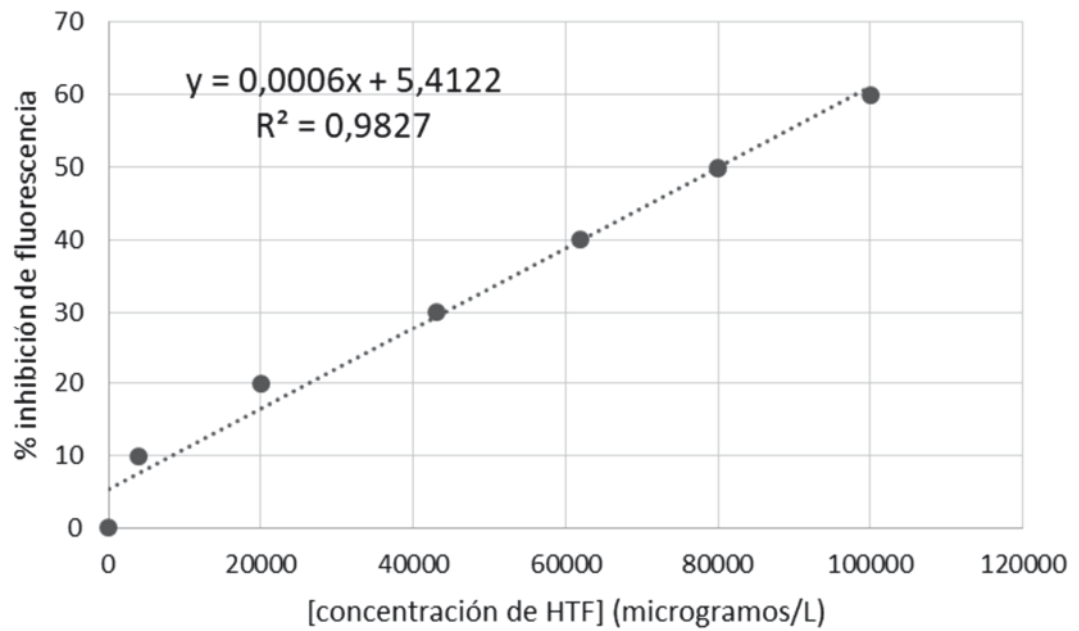


FIG. 2