



MATERIALES NANOESTRUCTURADOS ELECTROACTIVOS PARA ELECTRODOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, ESTIMULACIÓN Y REPARACIÓN

María Nieves Casañ Pastor

Institut de Ciència de Materials de Barcelona

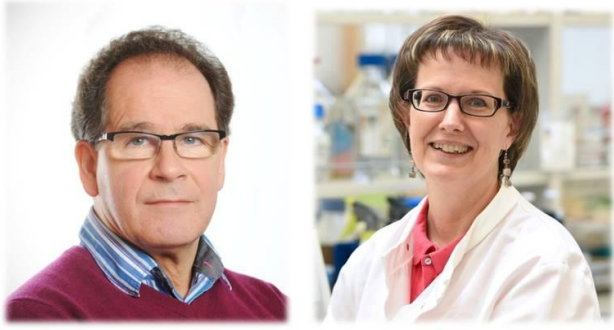
M. Cristina Suñol Esquirol

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Ann Marie Rajnicek

Institut of Medical Sciences Aberdeen, Regne Unit





1. Proyecto

La aplicación de campos eléctricos para reparación en lesiones necesita de nuevos materiales adecuados a tal fin. Hasta la fecha, la electroestimulación del sistema nervioso es funcional y trata de mitigar síntomas, lo que se consigue con pulsos de alta frecuencia para minimizar el daño al tejido circundante. Usualmente los electrodos son de platino o sus aleaciones, lo que origina la formación de radicales en la interfase electrodo-tejido derivados de la reducción del oxígeno o de la oxidación del agua, lo que siempre origina daño y encapsulación del electrodo. Este proyecto ha intentado desarrollar nuevos materiales o recubrimientos que faciliten un nuevo mecanismo en el que la aplicación del campo no resulte en formación de radicales, sino que el nuevo material, dadas sus propiedades de valencia mixta, asuma la transferencia electrón-ión de la interfase.

Así, el proyecto se ha enfocado a:

- A) Desarrollo de **nuevos materiales** electroactivos: materiales nanoestructurados de valencia mixta que funcionen como "amortiguadores" en ese intercambio en la interfase. Formación de híbridos y posible *liberación* durante el protocolo de acción.
- B) Desarrollo de **electrodos** basados en esos materiales híbridos con geometrías apropiadas a la aplicación de campo eléctrico.
- C) **Nanoestructuración** de electrodos como sistemas híbridos, que puedan superar los problemas de materiales individuales, aumentando la estabilidad del material, la capacidad de carga y su ciclabilidad. Más allá de la formación de híbridos, la formación de **multicapas o composites** puede reforzar el material y mejorar sus propiedades electroquímicas. Asimismo, la formación de recubrimientos puede permitir usar electrodos base ya comerciales. Se verá el efecto de los nanotubos como andamio de IrOx, o bicapas de polímeros conductores con aminoácidos. La superficie asimismo puede ser modulada eléctricamente y permitir incorporación de factores de crecimiento, principios activos o adherir moléculas significativas.
- D) **Diseño de la forma geométrica final** como *arrays* de microelectrodos, formas cilíndricas ajustadas a la médula espinal.

E) Evaluación *in vitro* de **electrodos** en ausencia y presencia de campos eléctricos aplicados.

2. Resultados

1) Se han obtenido nuevos materiales híbridos electroactivos de óxidos de iridio y nanocarbones como: **IrOx-nanotubos de carbono, IrOx-óxido de grafito, IrOx-óxido de grafeno o IrOx-grafeno prístino**, como capas finas transparentes que facilitan el estudio de cultivos o como recubrimientos gruesos de alta capacidad de carga. Polímeros conductores tales como **PEDOT o polypirrol con aminoácidos** se han obtenido en forma de bicapas de alta biocompatibilidad y reproducibilidad. Se ha demostrado que el IrOx se adhiere al grafeno en cualquiera de sus formas y a los nanotubos de carbono, dando lugar a un autoensamblado que genera una nanoestructuración y un nuevo material híbrido en forma coloidal, que luego puede electrodepositarse sobre un electrodo. El proceso funciona para todas las fases de carbono estudiadas y está dirigido por la deposición del IrOx. Asimismo es posible obtener un trihíbrido con polímeros conductores, pero en ese caso la capacidad de carga no aumenta. Ello demuestra que el carbono en forma nano aumenta la capacidad de carga y de forma estable, mientras que el polímero parece inhibir este efecto. Un ejemplo de la nanoestructura inducida se muestra en las imágenes SEM de la figura 1. Cuando el IrOx se combina con nanotubos de carbono (CNT) se forma un andamiaje que estabiliza el material en el repetido ciclado electroquímico cuando se aplica el campo eléctrico. **Los CNT actúan como los cables de acero del hormigón armado, pero a nivel nanométrico. Como resultado, las propiedades electroquímicas mejoran hasta 5 veces, y unas 100 respecto a los electrodos usuales de Pt** (figura 2).

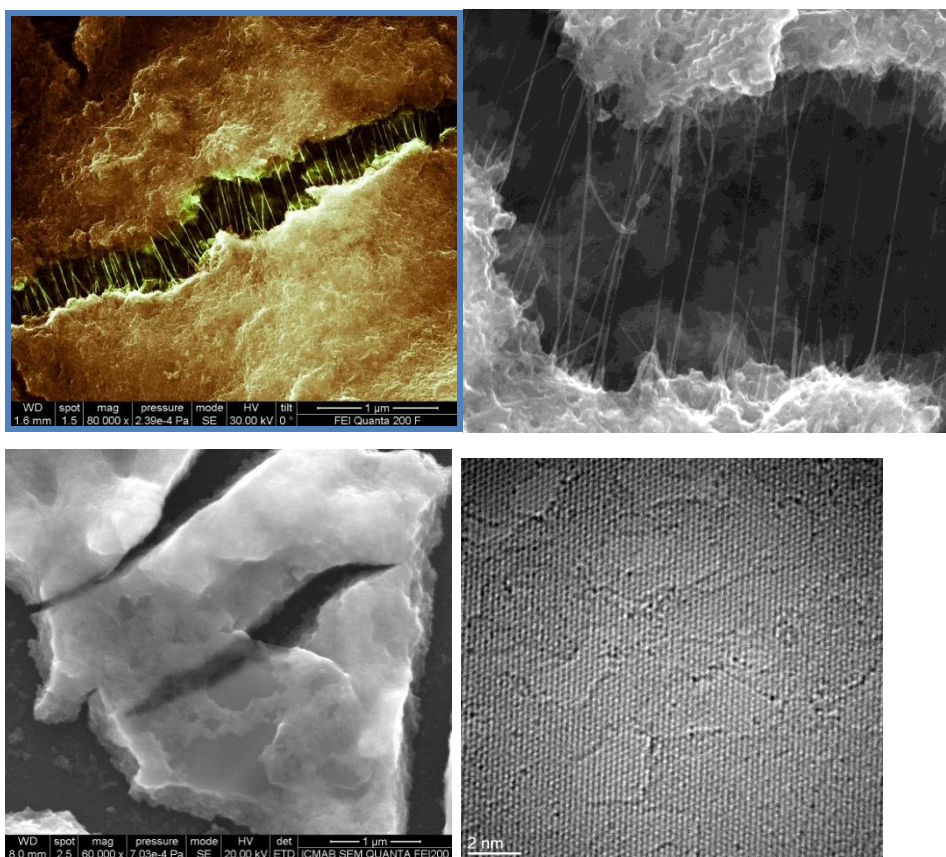


Figura 1. Imágenes de SEM de los IrOx-nanotubos de carbono, de los IrOx-nanotubos de carbono-PEDOT que muestran el andamiaje de los híbridos nanoestructurados, así como del material nanoestructurado en forma de milhojas de óxido de grafeno-IrOx, junto con el grafeno exfoliado (HRTEM).

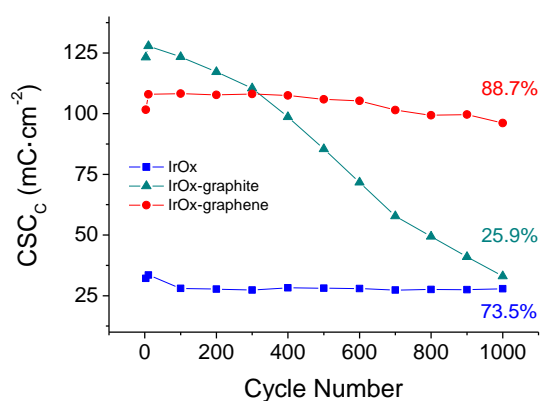
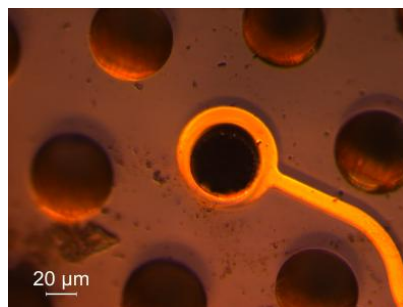


Figura 2. Capacidad de almacenamiento de carga (CSC), de los IrOx-grafito e IrOx-óxido de grafeno respecto a IrOx puro

Así, en la figura 2 se observa el cambio en capacidad de carga (CSC) de híbridos vs. IrOx puro, y su estabilidad en 1.000 ciclos. IrOx-grafeno mantiene su alta CSC tras 1.000 ciclos, mientras que IrOx grafito pierde pronto sus valores iniciales. El grafeno prístino es equivalente al óxido en este aspecto, aunque más metálico y con mayor contribución por átomo de C, y poseen mayor planaridad. La permanencia de IrOx como tal se constata por la relación de XPS constante K/Ir, en la fase caracterizada como **KzIrOx(OH)y.nH2O**. Solo la fase formada con óxido de grafeno contiene un exceso de oxígeno, mientras que el grafeno prístino lo deja igual.

2) Todas las fases descritas se pueden obtener como recubrimientos en sustratos de platino, vidrio o silicona médica platinizada o carbones flexibles o polímeros platinizados. Asimismo pueden electrodeponerse en cualquier geometría y tamaño, incluyendo microelectrodos, preservando las propiedades electroquímicas. Los procesos de electrodeposición desarrollados favorecen la adherencia al sustrato y la estabilidad en su uso como electrodo, e incluyen los electrodos comerciales. El grosor permite controlar la CSC final.



3) En todos los casos se han llevado a cabo cultivos primarios de neuronas y se han comparado con blancos positivos y negativos. La presencia de nanocarbones no disminuye la gran biocompatibilidad mostrada por el IrOx siempre, salvo si el carbón se nitrura, en cuyo caso resulta tóxico, mientras que los polímeros conductores PEDOT o polipirrol muestran irreproducibilidad a no ser que se obtengan con aminoácidos específicos como contraión. El mejor resulta ser una bicapa PEDOT-polipirrol con lisina.

Tabla 2. Comparación de materiales en términos de viabilidad celular en cultivos neuronales a 5 días *in vitro*.

	Material nanoestructurado	Viabilidad neuronal. % de neuronas (células con marcaje por la proteína tau) respecto al material control (borosilicato o IrOx)
Doped PEDOT monofilms	PEDOT-lysine 0,01 M	< 5%
	PEDOT-glutamine 0,01 M	< 5%
	PEDOT-glycine 0,1 M	< 5%
	PEDOT-glutamic acid 0,1 M	< 5%
	PEDOT- sodium glutamate 0,1 M	< 5%
	PEDOT-PSS	< 5%
Doped PPY monofilms	PPY-PSS	< 5%
	PPY-DBS	< 5%
Doped PEDOT/PPY bilayered films	PEDOT/PPY-glutamine 0,01 M	91 %
	PEDOT/PPY-glutamine 0,1 M	122 %
	PEDOT/PPY-lysine 0,01 M	97 %
	PEDOT/PPY-inosine	90 %
IrOx hybrids	IrOx-Carbon nanotubes (CNT)	90 %
	IrOx-PEDOT-CNT	< 5%
	IrOx-graphite oxide	112 %
	IrOx-graphene oxide	98 %
	IrOx-electrochemical graphene	94 %
Pt	Pt	< 5%

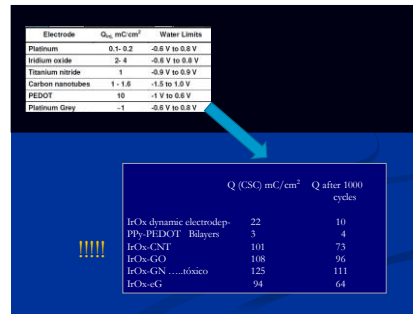
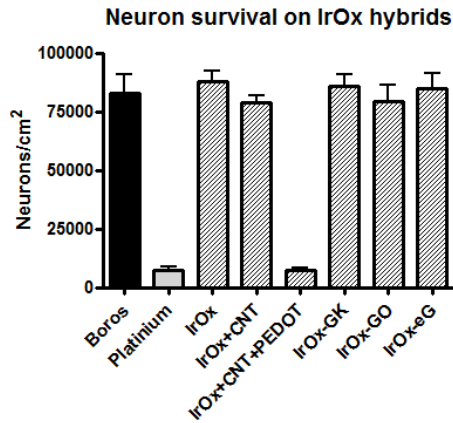


Figura 3. Cuantificación celular de cultivos neuronales sobre varios materiales, incluyendo fases de IrOx y sus híbridos y PEDOT así como comerciales de Pt.

La comparación de los materiales mostrada constituye el primer filtro de selección de materiales adecuados, previo a los ensayos de aplicación de campo. Por otra parte, la determinación de sus capacidades de carga será otro filtro entre los compatibles.

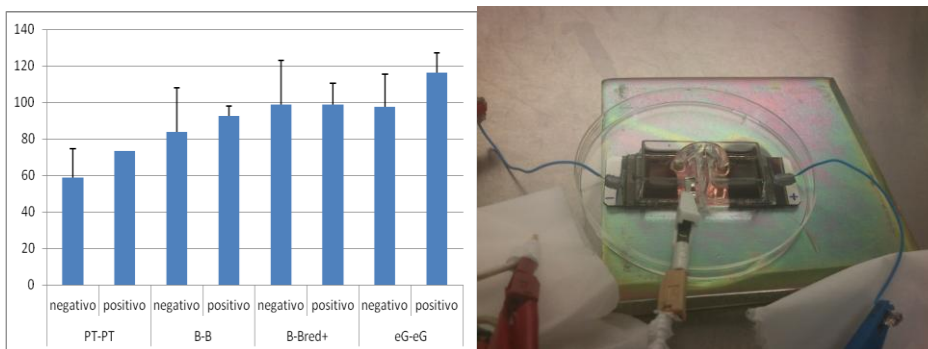


Figura 4. Valores de CSC previos a este proyecto y valores de materiales desarrollados en este proyecto.

4) Se ha **desarrollado un modelo *in vitro*, que imita una lesión**, el modelo de *scratch* o rotura de un sistema de cultivo, en el que luego se estudiará su reparación en ausencia y en presencia de campos, sin factores adicionales. Dicho método permite evaluar el material más idóneo como electrodo, la combinación de electrodos y el protocolo adecuado de campo aplicado, en comparación con los electrodos de Pt.

La comparación entre capacidades de carga de los anteriores materiales ya sugiere que los híbridos IrOx-nanocarbones, siendo biocompatibles, pueden resultar los idóneos. En

la comparación, sin embargo, se han incluido bicapas de PEDOT y polipirrol también compatibles para tener varios tipos de química en el proceso: IrOx, IrOx-grafeno, y PEDOT-ppy-lisina, y vidrio y Pt como referencias. Los protocolos de campo aplicados se basan en control de potencial, y limitación de corriente y carga total para impedir cambios de pH local y formación de gas, y comprobar la diferencia entre el proceso redox interno del electrodo y la parte capacitiva. **La viabilidad celular disminuye notablemente una vez se sobrepasa el valor de la capacidad de carga del electrodo, como ya esperábamos, confirmando la hipótesis inicial de este proyecto.** Además de cultivos neuronales, se han desarrollado cocultivos astrocitos-neuronas como modelo futuro. La aplicación de campo con electrodos de Pt reduce la regeneración espontánea en el cultivo, mientras que con IrOx-grafeno aumenta, indicando que este material sería el adecuado para el uso en ambos electrodos.

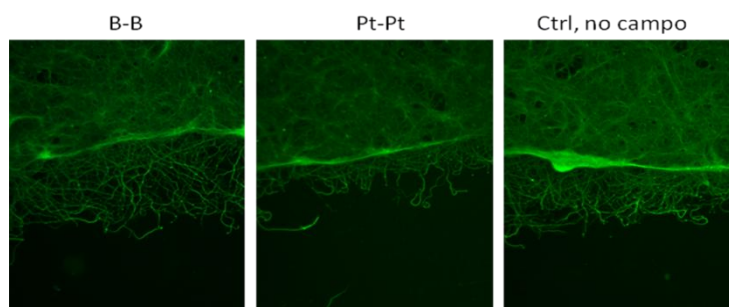


Figura 4. Esquema representativo de la regeneración conseguida con varios grupos de electrodos.

3. Implicaciones y relevancia

Se han desarrollado nuevos materiales nanoestructurados que han demostrado ser órdenes de magnitud mejores que el platino. Se ha observado regeneración de una lesión *in vitro*, y se ha evaluado las limitaciones de protocolos de aplicación de campo para ellos. Pueden ser usados como recubrimientos de los electrodos estándar en estimulación funcional. Se planea a corto plazo ensayos *in vivo* e histológicos.

4. Bibliografía derivada del proyecto y presentaciones

Elisabet Prats- Alfonso; Llibertat Abad; Nieves Casan- Pastor; Javier Gonzalo- Ruiz; Eva Baldrich.

*Iridium Oxide sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine Samples. **Biosensors and Bioelectronics**, 39, 2013, 163- 169 **SCI impact index: 5.437***

A.M. Cruz, N. Casañ-Pastor.

*Graded conducting titanium-iridium oxide coatings for bioelectrodes in neural systems **Thin Solid Films**, 534, 2013, 316–324, **SCI impact index: 1.97***

J. Moral-Vico , N. M. Carretero, E. Perez, C. Suñol, M. Lichtenstein, N. Casañ-Pastor.
Dynamic electrodeposition of aminoacid-polypyrrole on aminoacid-PEDOT substrates: conducting polymer bilayers as electrodes in neural systems.

Electrochim. Acta 111 (2013), 250-260. **SCI Impact index: 3.90**

J. Moral-Vico,, S. Sánchez-Redondo, E. Perez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor.

Nanocomposites of iridium oxide and conducting polymers as electroactive phases in biological media.

Acta Biomaterialia, 10 (2014) 2177–2186. **SCI impact index: 5.684**

Nina M. Carretero,† Mathieu P. Lichtenstein,‡ Estela Pérez,† Laura Cabana,† Cristina Suñol,‡,# Nieves Casañ-Pastor*†.

"IrOx-Carbon Nanotubes Hybrid:A Nanostructured Material for Electrodes with Increased Charge Capacity in Neural systems.

Acta Biomaterialia, 10, 2014, 4548-4558 . **SCI impact index: 5.684**

N. M. Carretero†, M. P. Lichtenstein††, E. Pérez†, S. Sandoval†, G. Tobias†, C. Suñol††# , N. Casan-Pastor†*

Enhanced Charge Capacity in Iridium Oxide-Graphene Oxide Hybrids.

Electrochimica Acta , 157, 2015, 369-377 **SCI impact index: 4.086**

E. Pérez, M. P. Lichtenstein, C. Suñol , N. Casan-Pastor*

Coatings of Nanostructured Pristine Graphene-IrOx Hybrids for Neural Electrodes: Layered Stacking and the role of non-oxygenated Graphene.

Materials Science & Engineering C, 55, **2015**, 218-226. **SCI impact index: 2.736**

PATENTE SOLICITADA

N. Casañ-Pastor, M. Lichtenstein, E. Pérez Soler, C. Suñol Esquirol.

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ELECTRODOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES NEURONALES MEDIANTE UN MODELO DE LESIÓN IN VITRO Y PROTOCOLOS DE ACCIÓN DE CAMPO ELÉCTRICO.

201531912, presentada 24 diciembre 2015

PUBLICACIONES EN PREPARACIÓN

Z. Zao, J. Moral, N. Casañ-Pastor, C. McCaig, A. Rajnicek

Neuron Growth and Survival on Conductive Materials during electric field exposure.

Biomaterials, para su envío en julio 2016

N. Carretero*, M. Lichtenstein*, J. Moral, E. Perez, C. Suñol*, N. Casan-Pastor*.

Iridium oxide hybrids containing carbon nanotubes and conducting polymers: A sequence of evaluation of electrodes for the neural system, and in vitro astrocytes-neuron co-culture cell model.

M. Lichtenstein, E. Perez, C. Suñol*, N. Casan-Pastor*.

Electric field protocols in Scratch model, using electroactive electrode materials.

E. Perez, R. Villa, S. Falk, G. Gabriel, N. Casan-Pastor*.

Electrodeposition of iridium oxide hybrids in microelectrodes, electrochemical properties and sensitivity.

INVITACIONES

Ann Rajnicek: **invited talks** at the Gordon research Conference in Bioelectrochemistry.

N. Casañ-Pastor: **invited seminar** at Georgetown University, DC, USA (octubre 2012).

N. Casañ-Pastor: **invited seminar** at IBEC (Barcelona), abril 2013

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

J. Moral-Vico, N.M. Carretero, E. Perez, C. Suñol, N. Casañ-Pastor .

Electroactive materials in Biological systems

Electrochemical Society, Hawaii, Octubre 2012. **Comunicación oral**

M.P. Lichtenstein, J. Moral-Vico, N.M. Carretero, N. Casañ-Pastor, C. Suñol.

Neural growth and functional development on new biocompatible hybrid materials.

Meeting of the Spanish Neuroscience Society. Oviedo. Septiembre 25-26, 2013. **Póster**

N. Carretero, Mathieu Lichtenstein , Cristina Suñol, , N. Casañ Pastor

Electrochemical Graphene and graphene Ir hybrids.

TNT Octubre 2014, Barcelona. Comunicación oral

N. Carretero, E. Perez, M. Alanyologlu, Mathieu Lichtenstein , Cristina Suñol, , N. Casañ Pastor.

Electrochemical Graphene and graphene Ir hybrids.

Graphene Symposium, **Trobades Científiques de la Mediterrania Josep Miquel Vidal**, Menorca, octubre, **2014. Comunicación oral**

M. Lichtenstein, E. Pérez, N. Carretero, N. Casañ-Pastor, C. Suñol

Glial and neural growth and functional development on new nanostructured iridium oxide hybrid materials.

5th Zing Conferences on Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Póster**

E.Perez^a, N. Carretero, M. Lichtenstein^b, C. Suñol^b, N. Casañ-Pastor^{a*}

Nanostructured materials for neural electrodes: Hybrids of iridium oxide with graphene, nanotubes or conducting polymers.

5th Zing Conference in Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Comunicación oral**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

IrOx nanoparticles driving graphene electrodeposition: Nanostructured coatings for neural bioelectrodes.

5th Zing Conference in Bionanomaterials. Algarve, abril 2015. **Pòster**

Estela Pérez, Sophia Falk, Rosa Villa, Gemma Gabriel Nieves Casañ-Pastor
Macro and microelectrodes based on iridium oxide-graphene hybrid nanostructured coatings (<http://graphsense.icn2.cat/>)

ICREA Workshop on Graphene Biosensors. Barcelona, 25-26 de mayo 2015.

Comunicación oral

N. Carretero, E. Perez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

<http://icmab.es/icmab-news/events/upcoming/262-june/1997-hintbcn-scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials>

Nanostructuring hybrid materials to be used as neural electrodes: Electrodeposition of Hybrids of IrOx-CNT, IrOx-graphene and IrOx-conducting polymers.

HINTBCN: Scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials. Barcelona, 8-9 de junio. **Comunicación oral**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

Synthesis and characterization of a new pristine graphene-IrOx hybrid for neural bioelectrodes

<http://icmab.es/icmab-news/events/upcoming/262-june/1997-hintbcn-scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials>

HINTBCN: Scientific-workshop-on-biomedical-health-and-bio-related-applications-of-hybrid-materials. Barcelona, 8-9 de junio. **Póster**

Resúmenes aceptados

R. Fernández-Pacheco, R. Arenal, E. Pérez, F. Sandiumenge and N. Casañ-Pastor
STEM and HRTEM Analysis of IrOx-Graphene Nanoparticles: at the Root of Bioelectroactive Coatings for Neural Electrodes.

Microscopy at the Frontiers of Science 2015 (MFS2015), EMS sponsored event. 9-11 septiembre 2015. Porto University. **Portugal**

E. Pérez, M. Lichtenstein, C. Suñol, N. Casañ-Pastor*

Pristine graphene versus Graphene Oxide in IrOx-Hybrids. Enhanced charge capacity in Coatings for Neural Electrodes.

Latest Advances on Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications (NANO BIOAPP2015). Barcelona, 8 septiembre 2015.