



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 246 135**

② Número de solicitud: 200400816

⑤ Int. Cl.:
C12N 11/04 (2006.01)
G01N 27/30 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **02.04.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

Fecha de la concesión: **10.10.2004**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2006

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **López Ruiz, Beatriz;
López Cabarcos, Enrique José y
Rubio Retama, Benito Jorge**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Partículas de microgel polimérico con glucosa oxidasa inmovilizada y su uso como biosensor de glucosa.**

⑦ Resumen:

Partículas de microgel polimérico con glucosa oxidasa inmovilizada y su uso como biosensor de glucosa.

La presente invención se refiere al diseño de un biosensor para la determinación de glucosa basado en un procedimiento para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en microgeles poliméricos que consigue mantener la actividad enzimática constante durante largos períodos de tiempo.

Comprende el diseño de un biosensor amperométrico de glucosa formado por un electrodo de platino sobre cuya superficie se inmoviliza la capa enzimática que consta de glucosa oxidasa atrapada dentro de microgeles de poli(ácido acrílico/acrilamida), que consiste en las siguientes etapas:

- Preparación de la emulsión concentrada acuosa/oleosa con el enzima, monómeros, agente entrecruzante, agente iniciador y tensioactivo.
- Polimerización de la emulsión concentrada a temperatura controlada.
- Recuperación del producto mediante la separación de fases por centrifugación.
- Conservación de las partículas de microgel, refrigeradas a 4°C.
- Preparación del biosensor. Como transductor se utiliza un electrodo de disco de platino. Sobre su superficie se incorporan las micropartículas con glucosa oxidasa en su interior y se fijan mediante una membrana de diálisis. La medida de glucosa se realiza en una celda ampero-

métrica de tres electrodos: como electrodo de trabajo el biosensor, como electrodo de referencia uno de plata cloruro de plata y como electrodo auxiliar uno de platino. La medida se realiza a +0,6 V vs. AgCl/Ag. La corriente obtenida esta directamente relacionada con la concentración de glucosa en la muestra.

ES 2 246 135 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Partículas de microgel polimérico con glucosa oxidasa inmovilizada y su uso como biosensor de glucosa.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere al diseño de un biosensor para la determinación de glucosa basado en un procedimiento para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en microgeles poliméricos que consigue mantener la actividad enzimática constante durante largos periodos de tiempo.

10 **Estado de la técnica**

15 Son numerosas las referencias bibliográficas que describen biosensores amperométricos con sustancias biológicas, especialmente enzimas, inmovilizadas en el interior de hidrogeles (Caras, S.D. *et al. Anal. Chem.* 1985, 57:1920-1923; Birch, M.E. *et al. Anal. Chem.* 1990, 62:1123-1130; Shul'ga, A.A. *et al. Sensor. Actuat. B* 1992, 10:41-46; Inoue, T. *et al. Polym. Gels Networks* 1997, 5:561-575; Coche-Guerente, L. *Anal. Chem.* 2001, 73:3206-3218; Jiménez, C. *et al. Anal. Chim. Acta* 1997, 351:169-176).

20 En muchos casos se prefieren hidrogeles conductores por facilitar la transferencia electrónica entre el enzima y el transductor (Schuhmann, W., *Rev. Mol. Biotech.* 2002, 82:425-441; Brahim, S. *et al. Biosens. Bioelectron.* 2002, 17:53-59; Brahim, S. *et al. Biosens. Bioelectron.* 2002, 17:973-981; Gaspar, S. *et al. Electrochim. Acta* 2000, 46(2-3): 255-264; Larsson, N. *et al. Electrochim. Acta* 1998, 43(23):3541-3554).

25 Muchos de estos sistemas de inmovilización no sólo han sido empleados en el desarrollo de biosensores, también han tenido gran repercusión en la fabricación de biorreactores (Santano, E. *et al.* 2002, *Enzyme Microb. Tech.* 2002, 30:639-646), en la industria alimentaria (Bryjak, J., *Biochem. Eng. J.* 2003, 16:347-355), como vehículos para vacunas (Suckow, M.A. *et al. J. Control. Release* 2002, 85:227-235). En los biosensores amperométricos modernos se observa una tendencia a inmovilizar el material biológico en el interior de sistemas micelares (Peña, N. *et al. Anal. Chem.* 2001, 73:1190-1195; Val, I. *et al. J. Mol. Catal. B* 1998, 4:137-147; Kriwet, B. *et al. J. Control. Release* 1998, 56:149-158), de micro y nanopartículas (Rodríguez, M. C. *et al. Anal. Chim. Acta* 2002, 549:43-5; Mecerreyes, D. *et al. Adv. Mater.* 2001, 13:204-208; Chen, X-Y. *et al. Biochem. Bioph. Res. Co.* 1998, 245:352-355) y más recientemente de microgeles (Val, I, Otero, C., 1998; Loxley, A. Vincent B., *Colloid. Polym. Sci.* 1997, 275:1108-1114), debido, en todos los casos, a las ventajas que la gran superficie específica aporta a la aplicación práctica. Muchos de estos sistemas se preparan a partir de polímeros gelificados (Coppi, G. *et al. Intern. J. Pharm.* 2002, 242:263-266), método que facilita la preparación de los geles. No obstante, este sistema de gelificación produce sistemas coloidales que se alteran y degradan con facilidad.

35 La presente invención incorpora los microgeles de poliacrilamida/poli(ácido acrílico) como sistemas de inmovilización de enzimas y su aplicación al diseño de biosensores amperométricos por presentar además de las ventajas inherentes a los hidrogeles, entre las que destacan el control del tamaño de poro, otras de gran interés como son la fácil manipulación de este material biológico, su gran estabilidad, inusual hasta el momento y la eliminación de interferencias producidas por sustancias de carácter amónico y habitualmente presentes en medios biológicos.

40 El método de inmovilización de enzimas en microgeles, que se propone en esta invención, destaca frente a los anteriores métodos de inmovilización por su extraordinaria estabilidad. Estos microgeles, transcurridos tres meses, presentan la misma actividad enzimática y, como consecuencia, originan la misma respuesta analítica en el biosensor amperométrico. Los biosensores más estables hasta ahora descritos, como el propuesto por Wang (Wang, S.G. *et al. Electrochem. Comm.* 2003, 5:800-803), transcurrido un mes presentaron un 96,3% de su actividad inicial y tras tres meses de su preparación la actividad enzimática descendió al 91,2% de la inicial.

50 La incorporación de ácido acrílico, como monómero, junto con lo acrilamida incorpora una carga negativa a los microgeles resultantes que eliminan las interferencias causadas por sustancias de carácter amónico presentes en medios biológicos (Rubio Retama, J. *et al. Biomaterials* 2003, 24:2965-2973).

55 Las nuevas e importantes aportaciones del método que se presenta sobre lo ya conocido son la mayor selectividad, la mencionada estabilidad y la sencilla preparación y manipulación de las micropartículas con el enzima en su interior, característica muy útil para diseñar biosensores de fácil comercialización.

60 **Descripción de la invención**

Partículas de microgel polimérico con glucosa oxidasa inmovilizada y su uso como biosensor de glucosa.

65 La presente invención se refiere a un procedimiento de inmovilización de enzima glucosa oxidasa sobre microgeles poliméricos y su uso como material biológico de un biosensor que permite medir glucosa discriminándola del ácido úrico y del ácido ascórbico.

El biosensor se prepara con partículas de microgel compuestas por poli(ácido acrílico) y poliacrilamida en propor-

ES 2 246 135 B1

ción 1:1 en peso y NN'-metilen-bisacrilamida como agente reticulante. La inclusión de la enzima en el interior de los microgeles se realiza mediante polimerización desde una emulsión concentrada acuosa/oleosa.

La fase continua oleosa está formada por una mezcla de dodecano y Span80. Para obtener la fase dispersa se utiliza una disolución tampón de fosfato de sodio de concentración 0,05 M en la cual se disuelven los monómeros de acrilamida, ácido acrílico y agente entrecruzante NN'-metilen-bisacrilamida. Se añade persulfato de amonio como agente iniciador, con el fin de eliminar el oxígeno disuelto se somete la mezcla a burbujeo con nitrógeno. Finalmente se incorpora la enzima en cantidades comprendidas entre 10 y 100 mg·mL⁻¹. La emulsión concentrada se forma inyectando la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa.

Una vez conseguida la emulsión concentrada, de aspecto lechoso, para que comience la polimerización se añade al sistema NNN'-trimetil-etilen-diamina que actúa como acelerador de la reacción. Se controla la temperatura de polimerización para asegurarse de que no se sobrepasa la temperatura de desnaturalización de la enzima. El sistema se mantiene en agitación hasta completar la polimerización.

Las partículas de gel se extraen precipitándolas con una disolución tampón fosfato y centrifugando posteriormente. Finalmente, las partículas se liofilizan y se conservan en cámara frigorífica.

Las enzimas así inmovilizadas mantienen su actividad constante durante largos períodos de tiempo, permitiendo su uso como material biológico para la preparación de biosensores.

Descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de las características de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras que representan lo siguiente:

La Figura 1 muestra una micrografía de las partículas de microgel con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en su interior.

La Figura 2 muestra el esquema de un biosensor de glucosa con partículas de microgel con glucosa oxidasa como material biológico, donde 1 es el contacto eléctrico, 2 el soporte de teflón, 3 el electrodo de platino, 4 la membrana de diálisis y 5 las micropartículas con GOx.

En la Figura 3 se representa la respuesta del biosensor amperométrico, preparado con micropartículas de poli(ácido acrílico)/poliacrilamida, frente a la concentración de glucosa.

La Figura 4 muestra la respuesta del biosensor con micropartículas de poliacrilamida (A) y del biosensor con micropartículas de ácido acrílico y poliacrilamida (B) frente a la glucosa y a posibles interferentes como el ácido úrico y ascórbico. Se observa como en el segundo caso los interferentes no generan señal.

En la figura 5 se representa la respuesta del biosensor a la glucosa a lo largo de un periodo de tres meses tras su preparación.

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos a su alcance.

Ejemplo 1

Método de inmovilización enzimática

En este ejemplo se describe la inmovilización de la enzima, que se lleva a cabo por polimerización desde una emulsión concentrada acuosa/oleosa.

A. Preparación de la emulsión concentrada acuosa/oleosa

La fase acuosa se obtiene empleando una disolución tampón, pH 7,2 de fosfato de sodio 0,05 M en la cual se disuelven los monómeros de acrilamida 1,75 M, ácido acrílico 1,75 M y agente entrecruzante NN'-metilen-bisacrilamida 3,25%; se añade persulfato de amonio 11 mM, como agente iniciador. La mezcla se somete a burbujeo de nitrógeno y se incorpora, como enzima, 50 mg·mL⁻¹ de glucosa oxidasa.

Para obtener la emulsión concentrada se inyecta la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa, formada por una mezcla de Dodecano y Span80. La emulsión resultante contiene un 13,89% de fase oleosa y un 86,11% de fase acuosa.

En la tabla se muestra la composición de las fases oleosa y acuosa de la emulsión concentrada utilizada para inmovilizar la enzima en el interior de los microgeles.

Fase Oleosa 13,89 %		
	Dodecano	75% (v/v)
	Span 80	25% (v/v)
Fase acuosa 86,11 %		
	Tampón pH 7,2	0,05 M
	Enzima	50 mg.mL⁻¹
	Acrilamida	1,75 M
	Ácido acrílico	1,75 M
	NN'-metilen-bis-acrilamida	3,25 %
	Persulfato de amonio	11 mM
Catalizador añadido a la emulsión.	NNN'-trimetil-etilen-diamina	1,25 %

B. Polimerización de la emulsión concentrada

Se añade a la emulsión concentrada anterior NNN'-trimetil-etilen-diamina, que actúa como catalizador, y se mantiene el sistema en agitación durante 60 minutos (tiempo suficiente para completar la polimerización) a una temperatura inferior a la de desnaturalización de la enzima.

C. Recuperación del producto

Las micropartículas del gel obtenido se extraen mediante precipitación con una disolución tampón fosfato 0,05M, pH 7,2, y centrifugando a 500 r.p.m.

D. Conservación de las partículas de microgel

Las micropartículas se liofilizan y se conservan en cámara frigorífica a 4°C.

Las micropartículas así obtenidas están compuestas por poli(ácido acrílico) y poliacrilamida en proporción 1:1 en peso con NN'-metilen-bisacrilamida como agente reticulante en cuyo interior se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa. La forma de las partículas es esférica y sus dimensiones varían entre 0,5 μm y 12 μm (Figura 1).

Ejemplo 2

Biosensor de glucosa en suero

El biosensor consta de un transductor (electrodo de disco de platino) y material biológico (partículas de microgel compuestas por poli(ácido acrílico) y poliacrilamida con glucosa oxidasa en su interior, obtenidas según el ejemplo 1, fijadas a la superficie del electrodo mediante una membrana de diálisis. El esquema del biosensor se muestra en la Figura 2.

En la Figura 3 se muestra la respuesta del biosensor en función de la concentración de glucosa. Se observa que dicha respuesta se ajusta a un comportamiento Michaelis-Menten, indicando que la matriz polimérica protege a la enzima sin influir en su cinética y actividad enzimática.

Por otro lado, la composición 1:1 poliacrilamida/poli(ácido acrílico) confiere a las micropartículas del gel carga negativa. Esta carga negativa impide la aproximación a la superficie del electrodo de especies con carga negativa neta, como el ácido ascórbico y ácido úrico que, al potencial de lectura (+0,6 V), darían una señal de corriente no deseada. En la Figura 4 se muestra cómo la carga negativa que confiere el poli(ácido acrílico) al microgel elimina las interferencias que originaban el ácido ascórbico y ácido úrico cuando se utilizan partículas de microgel sin carga.

Ejemplo 3

Estabilidad de la actividad enzimática

5 El estudio cuantitativo de la estabilidad de los microgeles descritos en el ejemplo 1 se realizó empleando el biosensor amperométrico del ejemplo 2. La respuesta del biosensor a una misma concentración de glucosa, permanece constante durante al menos 120 días, constatándose que las micropartículas liofilizadas mantienen su morfología y su actividad enzimática al menos tres meses después de su preparación, según muestra la Figura 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, **caracterizadas** porque contienen poliacrilamida y poli(ácido acrílico) en proporción 1:1, agente entrecruzante NN'-metilen-bisacrilamida al 3,25% y en cuyo interior se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa.
2. Partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 1, **caracterizadas** por poseer forma esférica y tamaños entre 0,5 μm y 12 μm .
- 10 3. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior descritas en las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: (1) preparación de una emulsión concentrada acuosa/oleosa que contiene la enzima glucosa oxidasa, (2) polimerización de la emulsión concentrada, (3) recuperación del producto y (4) conservación de las partículas de microgel.
- 15 4. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, **caracterizado** porque la fase oleosa está formado por una mezcla de dodecano (75%v/v) y Span80 (25% v/v).
- 20 5. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, **caracterizado** porque la fase acuosa contiene acrilamida 1,75 M, ácido acrílico 1,75 M, NN'-metilen-bisacrilamida 3,25%, disolución tampón fosfato 0,05M, pH 7,2 y enzima glucosa oxidasa en cantidades comprendidas entre 10 y 100 mg-mL⁻¹.
- 25 6. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicaciones 3, 4 y 5, **caracterizado** porque la preparación de la emulsión concentrada acuosa/oleosa se realiza inyectando la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa.
- 30 7. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, 4, 5 y 6, **caracterizado** porque utiliza una emulsión concentrada acuosa/oleosa que contiene un 13,89% de fase oleosa y un 86,11% de fase acuosa.
- 35 8. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, **caracterizado** porque la polimerización se realiza utilizando como catalizador NNN'-trimetil-etilendiamina (1,25% v/v) y controlando al temperatura para evitar la desnaturalización de la enzima.
- 40 9. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, **caracterizado** porque la recuperación del producto se realiza mediante la separación de fases por centrifugación.
- 45 10. Método de obtención de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 3, **caracterizado** porque las partículas se liofilizan antes de conservarse en cámara frigorífica.
11. Uso de las partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior descritas en las reivindicaciones 1 y 2, como biosensor de glucosa.
12. Uso de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicación 11, donde el biosensor consta de un electrodo de disco de platino como transductor.
- 50 13. Uso de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicaciones 11 y 12, donde el biosensor discrimina la señal de glucosa de la del ácido úrico por poseer las partículas carga superficial negativa.
- 55 14. Uso de partículas de microgel polimérico con enzima inmovilizada en su interior, según reivindicaciones 11 y 12, donde el biosensor discrimina la señal de glucosa de la del ácido ascórbico por poseer las partículas carga superficial negativa.

60

65

FIGURA 1

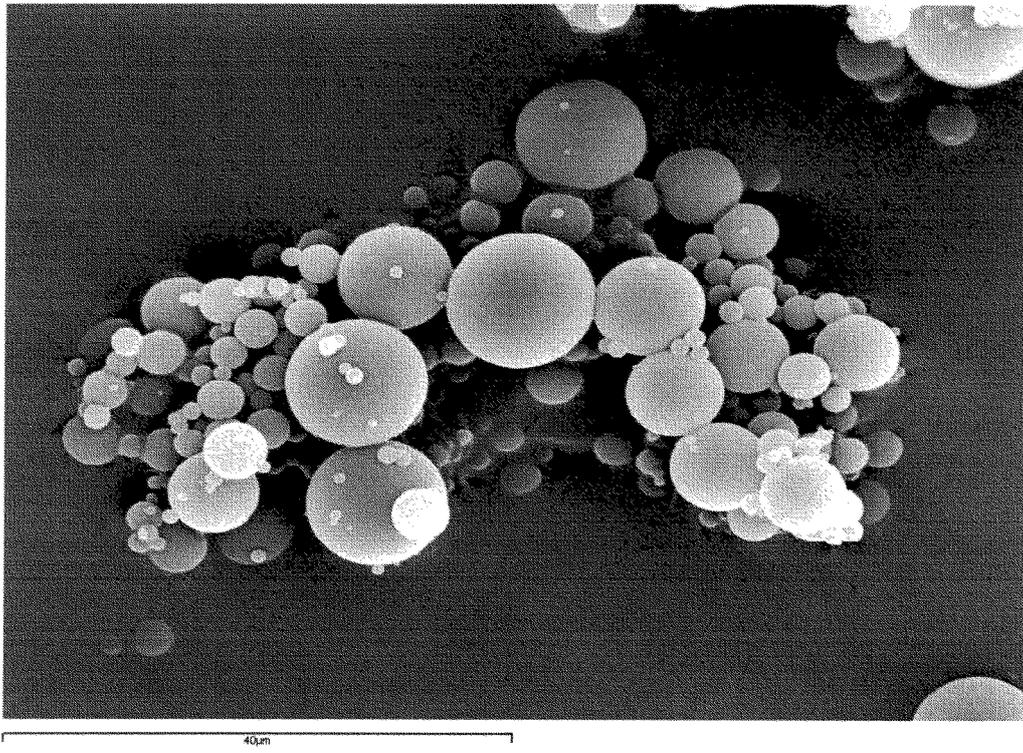


FIGURA 2

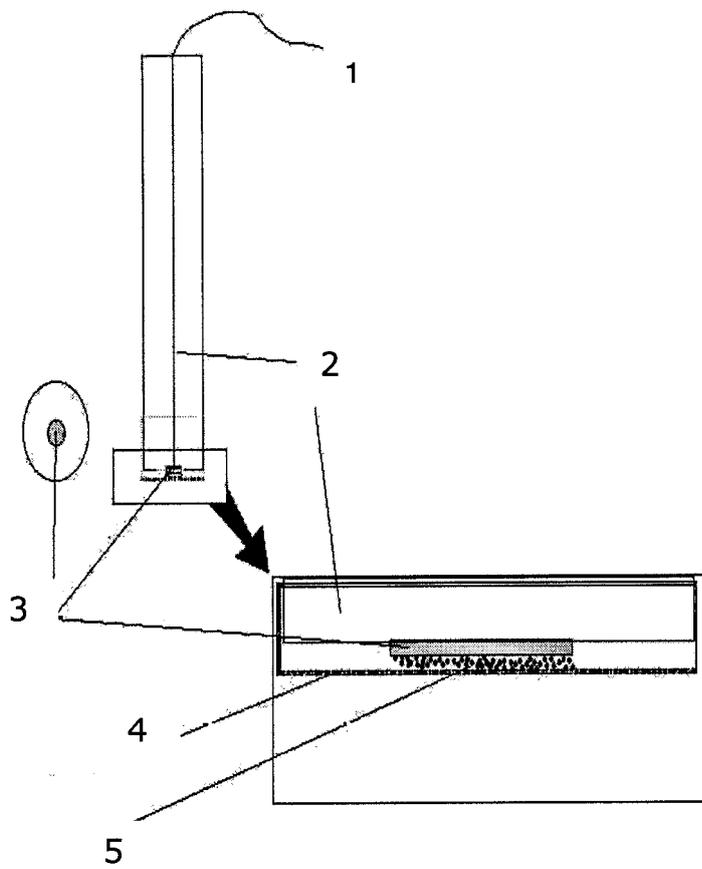


FIGURA 3

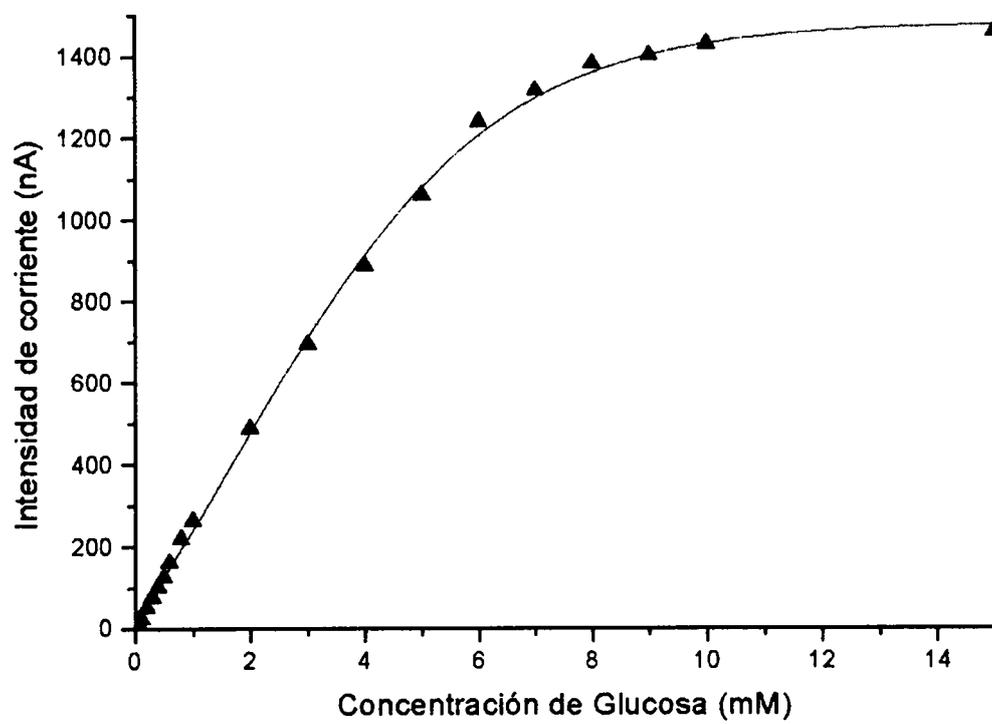


FIGURA 4

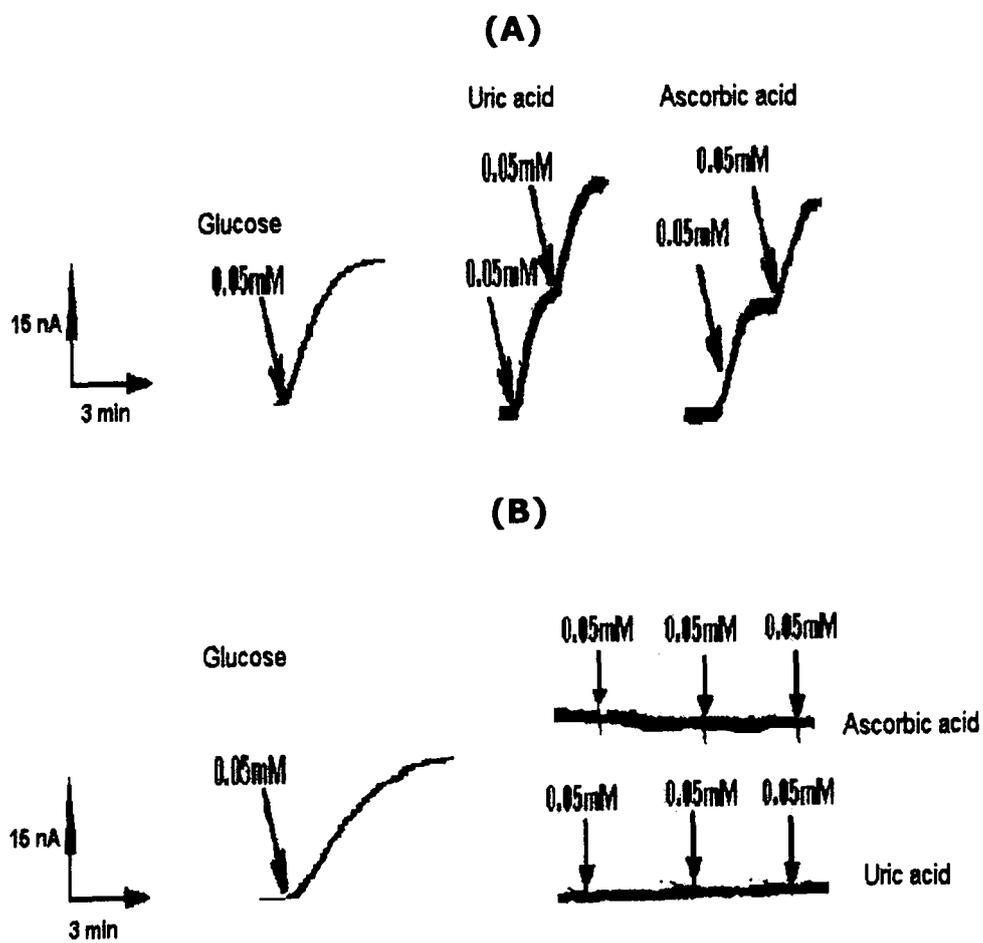
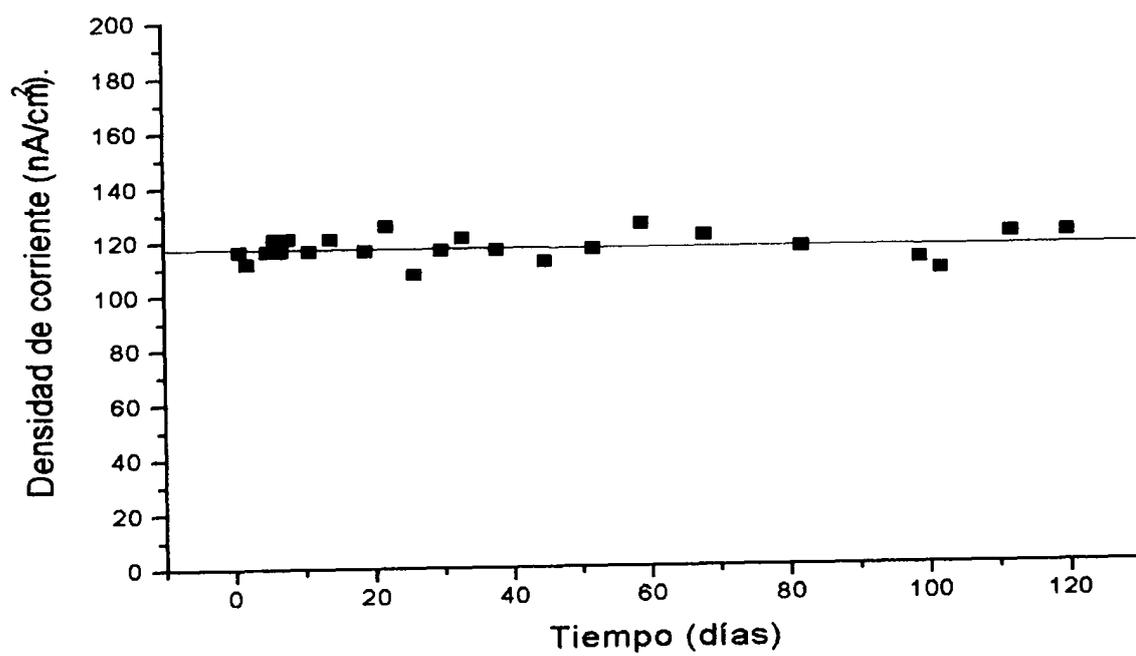


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 246 135

② Nº de solicitud: 200400816

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.04.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 11/04** (2006.01)
G01N 27/30 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RUBIO RETAMA, J. et al. Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. <i>Biomaterials</i> , 24, (2003), páginas 2965-2973.	1-14
A	SU 958950 A (LENGD PAVLOV MED INST-MED LAB TECHN RES DES) 25.09.1982, (resumen) [en línea] [recuperado el 19.12.2005] Recuperado de: EPO WPI Database, DW 198331, nº acceso 1983-727063 [31].	1-14
A	WANG, S.G. et al. Multi-walled carbon nanotubes for the immobilization of enzyme in glucose biosensors. <i>Electrochem. Comm.</i> , 5, (2003), páginas 800-803.	1-14
A	GB 2215335 A (SHELL INTERNATIONALE RESEARCH MAATSCHAPPIJ, B.V.) 20.09.1989	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.12.2005

Examinador
N. Vera Gutiérrez

Página
1/1