



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 319 059**

② Número de solicitud: 200702403

⑤ Int. Cl.:
C12N 11/14 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)
C01B 25/32 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.09.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **27.01.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **12.02.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avda. de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **López Ruiz, Beatriz;
López Cabarcos, Enrique;
Sánchez-Paniagua López, Marta y
Tamimi Mariño, Faleh**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Brushita como sistema de inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos biocompatibles.**

㉑ Resumen:

Brushita como sistema de inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos biocompatibles.

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de inmovilización enzimático que utiliza un material inorgánico biocompatible (Brushita, un cemento fraguado de fosfato cálcico) como matriz para la adsorción de enzimas y a un biosensor amperométrico preparado con dicho sistema de inmovilización. Comprende el procedimiento de fabricación del biosensor y su aplicación en medios acuosos y predominantemente orgánicos.

En el proceso de fabricación del biosensor, primero se deposita una mezcla brushita-enzima sobre la superficie electrodo y se deja secar al aire, a temperatura ambiente. Posteriormente se procede a la reticulación intermolecular del enzima adsorbido a la matriz, manteniendo el electrodo modificado en vapor de glutaraldehído. El biosensor resultante se utiliza para la determinación de analitos en disolventes acuosos y medios predominantemente orgánicos.

ES 2 319 059 B1

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

DESCRIPCIÓN

Brushita como sistema de inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos biocompatibles.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de inmovilización enzimático que utiliza un material inorgánico biocompatible (Brushita, un cemento fraguado de fosfato cálcico) como matriz para la adsorción de enzimas, y a un biosensor para la determinación de analitos en medios acuosos y no acuosos basado en un sistema de inmovilización de enzimas sobre brushita.

Estado de la técnica

Los biosensores constan de un transductor y un material biológico y uno de los aspectos más relevantes en la aplicabilidad de un biosensor es el tipo y calidad del material biológico. En este sentido se han propuesto distintos sistemas de inmovilización, entre ellos la adsorción de las biomoléculas sobre distintos materiales. Se trata de un método sencillo que consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones entre la biomolécula y la matriz.

En la patente FR 2667077 se detalla el proceso de inmovilización de una proteína, preferentemente una enzima, por adsorción en un soporte sólido de un electrodo (vidrio, metal, polímero, componente de tela, fibra óptica, etc.) y posterior reticulación por vaporización de un agente reticulante (glutaraldehído) por pulverización, para hacer más estable la enzima. En esta patente se reivindica también un biosensor que utiliza un electrodo enzimático obtenido a través de este proceso de inmovilización para la determinación de analitos en disoluciones acuosas que presenta tiempos de respuesta cortos (del orden de 5-10 segundos).

Se han descrito distintos biosensores enzimáticos amperométricos que utilizan como soporte para la adsorción de la enzima matrices inorgánicas como arcillas del tipo laponita (Cosnier and col., Mater. Sci. Eng., C., 2006, 26, 442-447; Li and Hu., J. Electroanal. Chem., 2003, 558, 155-165) e hidróxidos de doble capa (Mousty *et al.*, Biosens. Bioelectron., 2007, 22, 1733-1738), nanopartículas de carbonato cálcico (Shan *et al.*, Biosens. Bioelectron., 2007., 22, 1612-1617), nanopartículas de oro (Zhang *et al.*, Biosens. Bioelectron., 2005, 21, 337- 345), nanotubos de carbono (Zhao *et al.*, Electrochem. Commun., 2003, 5, 825-829) e híbridos de nanopartículas de oro con nanotubos de carbono (Chen *et al.*, Biosens. Bioelectron., 2007, 22, 1268-1274) utilizándose para la determinación de analitos en medios acuosos. Entre las ventajas más importantes de estos biosensores destacan, en algunos casos, la biocompatibilidad de las matrices de inmovilización, en otros la conductividad eléctrica de los materiales utilizados, en otros la estabilidad de los biosensores y en otros su sencilla fabricación.

En los últimos años se han desarrollado los llamados biosensores de fase orgánica, que son dispositivos capaces de trabajar en disolventes orgánicos, pudiéndose utilizar para la determinación de analitos en muestras de muy distinta naturaleza y ampliando así el campo de aplicación de los biosensores (Sánchez-Paniagua *et al.*, 2006., Biomol. Eng., 23, 135-147; Sánchez-Paniagua *et al.*, Biosens. Bioelectron., 2006, 21, 2320-2328).

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a un nuevo sistema de inmovilización enzimático que combina adsorción y entrecruzamiento y utiliza como matriz para la adsorción de enzimas un material inorgánico la brushita (cemento fraguado de fosfato cálcico) que es biocompatible (Kumta *et al.*, Acta Biomater., 2005., 1, 65-83) y posee, además, características de electrolito sólido (Tortet y col., J. Solid State Chem., 1997., 132, 6-16). Así mismo se refiere a un biosensor amperométrico cuyo componente biológico consiste en uno o más enzimas inmovilizadas en dicha matriz, para la determinación de analitos en medios acuosos y predominantemente orgánicos.

Las aportaciones más importantes de este nuevo dispositivo combinan la sencilla y rápida fabricación del biosensor como consecuencia de la inmovilización por adsorción, la ampliación del campo de aplicación del biosensor a estudios “*in vivo*”, como consecuencia de utilizar una matriz biocompatible, así como a muestras de naturaleza hidrofóbica, ya que permite realizar medidas en medios no acuosos, y a la determinación de analitos a niveles traza por la elevada sensibilidad de estos dispositivos.

Descripción de la invención

Brushita como sistema de inmovilización de enzimas y su uso en biosensores amperométricos biocompatibles.

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de inmovilización enzimático que utiliza un material inorgánico biocompatible (Brushita, un cemento fraguado de fosfato cálcico) como matriz para la adsorción de enzimas, y a un biosensor amperométrico basado en dicho sistema de inmovilización. Comprende el procedimiento de fabricación del biosensor y su aplicación en medios acuosos y predominantemente orgánicos.

La fabricación del biosensor es un proceso sencillo que requiere los siguientes pasos: (1) adsorción de la enzima en la brushita y (2) entrecruzamiento intermolecular enzimático con un agente entrecruzante. En primer lugar, se deposita una mezcla brushita-enzima sobre la superficie de un electrodo y se deja secar al aire, a temperatura ambiente.

ES 2 319 059 B1

El electrodo modificado se mantiene en vapor de glutaraldehído para llevar a cabo la reticulación enzimática, que evita en gran medida la pérdida de enzima aumentando la estabilidad del biosensor. En la Figura 1 se muestra una micrografía de la superficie electródica después de producirse la adsorción y reticulación enzimática, observándose pequeñas partículas en buen contacto con la superficie del metal.

5

El material biológico que se encuentra inmovilizado en brushita puede ser una o más enzimas oxidorreductasas. Para el entrecruzamiento químico se puede utilizar cualquier reactivo polifuncional que sirva como agente reticulante enzimático. El tipo de electrodo (transductor) utilizado dependerá del analito a determinar.

10 La proporción enzima-brushita en la mezcla puede variar entre 0,25 y 1,5; la cantidad de mezcla enzima-brushita depositada en la superficie electródica de área 0,07 cm², puede variar entre 12,5 μg-100 μg y tiempo de entrecruzamiento enzimático entre 5 y 25 minutos.

15 La determinación de los analitos con el biosensor propuesto se lleva a cabo mediante amperometría, en agitación constante, en una celda electroquímica termostatazada, que contiene el biosensor, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia, manteniendo el biosensor al potencial adecuado constante. Como consecuencia de la reacción entre la enzima inmovilizada y el analito, se produce la transformación química del sustrato. En la superficie del electrodo de trabajo (biosensor) tiene lugar la reacción redox de alguna de las especies que participan en la reacción enzimática, generándose una intensidad de corriente que estará relacionada con el analito presente en la muestra. El biosensor
20 resultante permite la determinación de analitos en disolventes acuosos y medios predominantemente orgánicos.

Descripción de las figuras

25 La Figura 1 muestra la micrografía de las muestras tirosinasa/brushita con entrecruzamiento con glutaraldehído sobre una superficie metálica.

La Figura 2 muestra la curva de calibrado de catecol en medio acuoso obtenida con el biosensor de tirosinasa/brushita en disoluciones tampón fosfato 0,1 M pH 6,0.

30 La Figura 3 muestra las curvas de calibrado de catecol en medios predominantemente orgánicos obtenidas con el biosensor de tirosinasa/brushita en mezclas de disolvente orgánico:tampón (98,5:1,5): (a) etanol:tampón y (b) acetonitrilo:tampón.

35 La Figura 4 muestra la estabilidad del biosensor propuesto en (a) medio acuoso y (b) mezclas acetonitrilo:tampón (98,5:1,5).

Modo de realización de la invención

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

Ejemplo 1

Preparación de biosensor de tirosinasa inmovilizada en brushita sobre un electrodo de carbón vitrificado

45 Para la fabricación del biosensor se prepara una suspensión de cemento de brushita (2 mg mL⁻¹) por dispersión en agua desionizada mediante agitación durante, al menos, 12 horas y una disolución de enzima (2 mg mL⁻¹) en agua desionizada. Una cantidad de la mezcla acuosa de tirosinasa/brushita (25 μg:25 μg) se deposita sobre la superficie (0,07 cm²) de un electrodo de carbón vitrificado. Se mantiene el electrodo al aire durante 2 horas para que se produzca el secado total de la película. Posteriormente, se produce un entrecruzamiento químico de las moléculas de enzima,
50 manteniendo el electrodo durante 15 minutos en vapor de glutaraldehído.

Ejemplo 2

55 *Determinación de la concentración de un derivado fenólico (catecol) disuelto en medio acuoso y medio predominantemente orgánico*

El biosensor preparado según se describe en el ejemplo 1 se utiliza para la determinación de catecol disuelto en disolución tampón fosfato (Figura 2) y en medios predominantemente orgánicos, como son mezclas acetonitrilo-tampón (98,5:1,5) y etanol-tampón (98,5:1,5) (Figura 3), mediante medidas amperométricas con agitación constante,
60 aplicando al electrodo de trabajo un potencial de -0,1 V vs electrodo de calomelanos saturado, potencial al cual se reduce la o-quinona producida en la reacción enzimática.

Las características analíticas obtenidas en la determinación de catecol en disolución tampón fosfato son sensibilidad 46,57 A M⁻¹ cm⁻², intervalo lineal 3 10⁻⁹-3 10⁻⁶ M y límite de detección, correspondiente a 3 veces la señal del ruido, 1 nM. La concentración máxima admisible para el contenido total de fenoles en aguas de bebida según la legislación de la Unión Europea (Directiva 80/778/EEC), es de 5 10⁻⁹ M. Teniendo en cuenta el límite de detección obtenido con este biosensor (1nM), estos dispositivos surgen como una interesante alternativa para este tipo de análisis.

ES 2 319 059 B1

Cuando el catecol se encuentra disuelto en un disolvente predominantemente orgánico, como es la mezcla acetonitrilo:tampón fosfato (98,5-1,5), se obtiene una sensibilidad de $3,3 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, un intervalo lineal de $4 \cdot 10^{-8}$ - $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y un límite de detección de 40 nM. Estos resultados demuestran que el biosensor se puede utilizar en el análisis de muestras orgánicas.

5

Los tiempos de respuesta obtenidos con estos biosensores fueron siempre menores de 12 segundos, característica que permite su uso como detectores en sistemas de flujo continuo.

Ejemplo 3

10

Estabilidad del biosensor

El biosensor, en medio acuoso, es muy estable durante los cinco primeros días (las señales obtenidas se mantienen por encima del 95% de la señal inicial), descendiendo la señal un 20% el séptimo día y un 60% al transcurrir 9 días. En medio no acuoso el biosensor es muy estable durante 3 días, comenzando el descenso de la señal a partir del cuarto día, tal y como muestra la Figura 4.

15

Ejemplo 4

Precisión del método analítico

Para evaluar la precisión del método analítico se estudió la repetibilidad y precisión intermedia en medios acuoso y predominantemente orgánicos, obteniéndose los siguientes resultados. Se midió la corriente generada por una disolución de catecol en tampón de 100 nM y una disolución de catecol $0,8 \mu\text{M}$ en acetonitrilo-tampón fosfato (98,5:1,5). En medio acuoso se obtiene un coeficiente de variación (CV) en el estudio de repetibilidad de 2,37% (n=10) y de 3,87% (n=20) para la precisión intermedia. Los CV obtenidos en disoluciones no acuosas para repetibilidad y precisión intermedia fueron 3,62% (n=10) y 5,55% (n=20) respectivamente.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 059 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material biológico con enzima inmovilizada en su interior **caracterizado** porque contiene una o varias enzimas adsorbidas en brushita.
2. Material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicación 1, **caracterizado** porque las enzimas son oxidoreductasas.
- 10 3. Método de obtención del material biológico con enzima inmovilizada descrito en las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: (a) adsorción del enzima a brushita y (b) reticulación intermolecular del enzima por vapor de glutaraldehído.
4. Uso del material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicación 1, como parte de un biosensor.
- 15 5. Uso del material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicación 4, donde el biosensor realiza medidas amperométricas en disoluciones por agitación constante.
- 20 6. Uso del material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicaciones 4 y 5, donde el biosensor consta de un electrodo en cuya superficie se deposita una mezcla de enzima-brushita.
7. Uso del material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicaciones 4, 5 y 6, donde el biosensor determina analitos en medios acuosos.
- 25 8. Uso del material biológico con enzima inmovilizada, según reivindicaciones 4, 5 y 6, donde el biosensor determina analitos en medios predominantemente orgánicos.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 059 B1

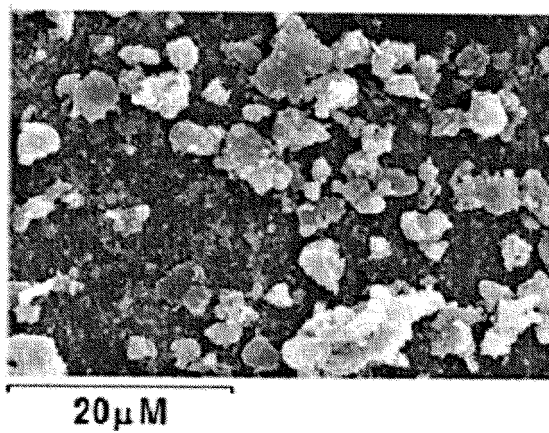


FIGURA 1

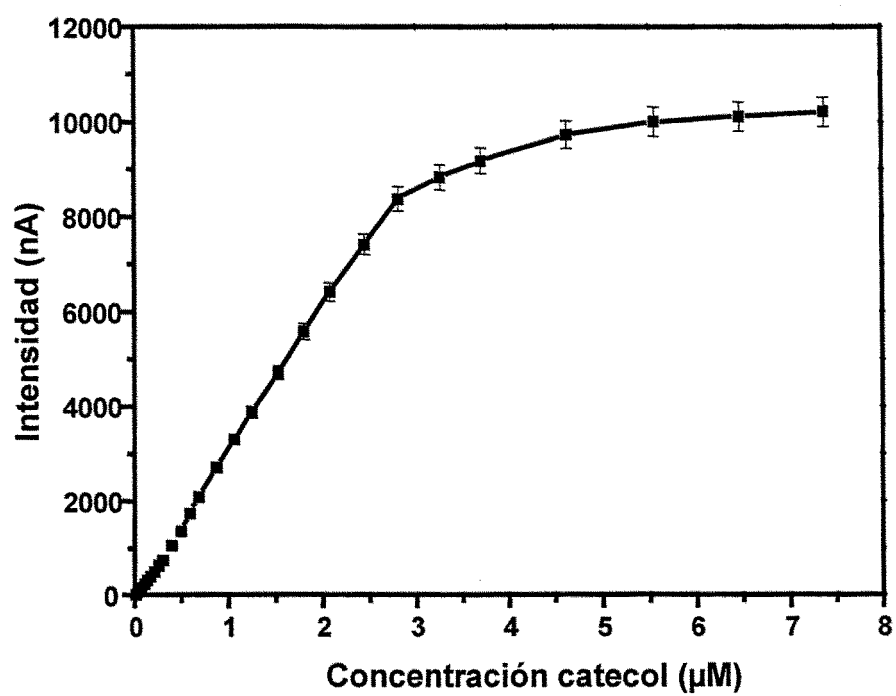


FIGURA 2

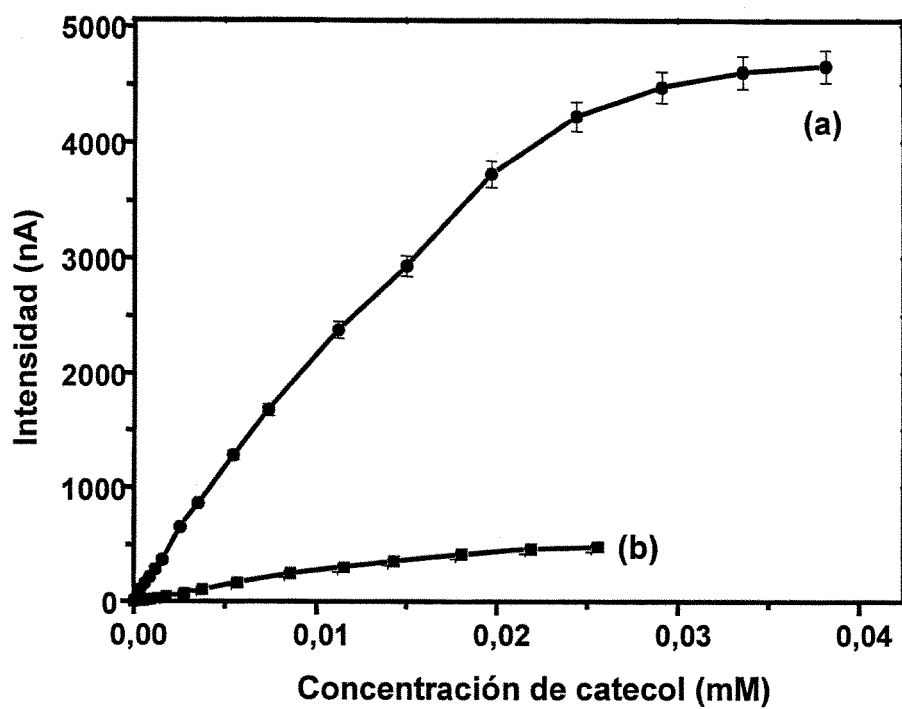


FIGURA 3

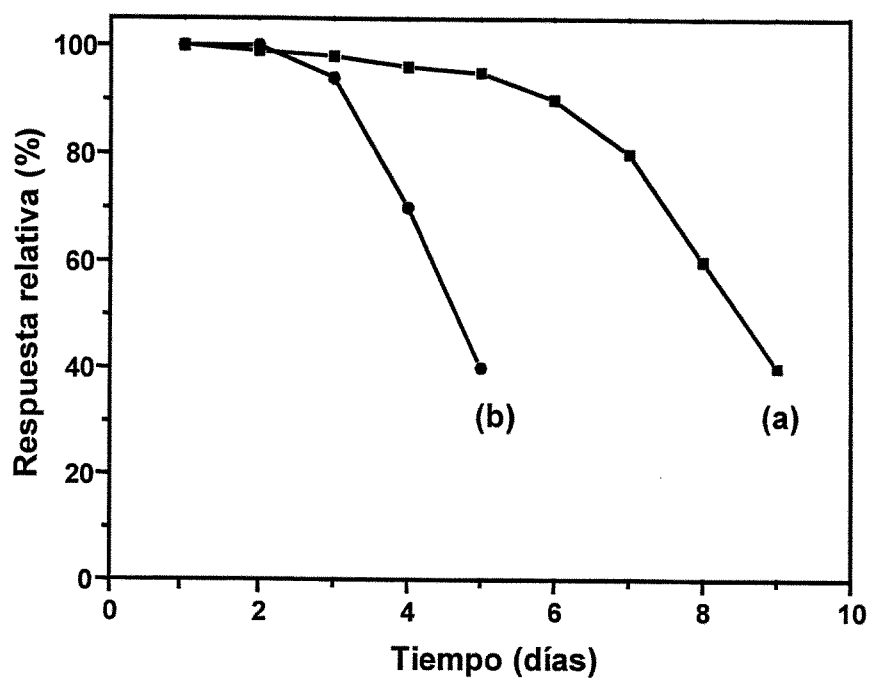


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 059

② Nº de solicitud: 200702403

③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HJERTÉN, S. et al. "Immobilization of Enzymes on Columns of Brushite". Journal of Chromatography, 1981, Volumen 215, páginas 25-30. Ver página 25, resumen.	1,2
Y		3
Y	US 4812404 A1 (KUBOKI, Y. et al.) 14.03.1989, columna 3, líneas 7-9; reivindicaciones.	3
A	US 20060204580 A1 (GOWER, L.B. et al.) 14.09.2006, reivindicaciones 1,9,11,21,22.	1
A	SHAN, D. et al. "A New Polyphenol Oxidase Biosensor Mediated by Azure B in Laponite Clay Matrix". Electroanalysis, 2003, Volumen 15, Número 19, páginas 1506-1512. Ver página 1506, resumen.	1-8
A	MOUSTY, C. et al. "Rutin Determination at an Amperometric Biosensor". Electroanalysis, Enero 2007, Volumen 19, Números 2-3, páginas 253-258. Ver página 253, resumen.	1-8
A	US 6004786 A1 (YAMASHITA, Y. et al.) 21.12.1999, columna 1, líneas 8-12; ejemplos 1-3.	1-8
A	SHAN, D. et al. "Layered Double Hydroxides: An Attractive Material for Electrochemical Biosensor Design". Analytical Chemistry, 2003, Volumen 75, Número 15, páginas 3872-3879. Ver página 3872, resumen; página 3873, Sección Experimental.	1-8

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

27.03.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 11/14 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C01B 25/32 (2006.01)