

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 314**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/30** (2006.01)

**G01N 27/327** (2006.01)

**C12Q 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2009 E 09793977 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2374898**

54 Título: **Soporte de biosensor**

30 Prioridad:

**11.07.2008 ES 200802126**

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

**18.07.2013**

73 Titular/es:

**BIOLAN MICROBIOSENSORES, S.L. (100.0%)  
Parque tecnológico Bizkaia Ibaizabal bidea 800  
2da planta  
48160 Derio (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:

**ARQUERO CAVIA, DANIEL y  
ALBIZU LLUVIA, ASIER**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel**

**ES 2 414 314 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

La presente invención se basa en un dispositivo que sirve de base para la colocación de una sustancia enzimática u otra de cualquier índole con la finalidad de crear un biosensor para la detección específica de sustancias en medios acuosos.

En el estado de la técnica ya se conocen soportes similares, pero están basados en láminas macizas, preferiblemente circulares, de oro, carbón o platino. Dichas láminas están fabricadas de metal puro con un espesor de uno o varios milímetros. La parte exterior, donde se depositan las enzimas, está pulida y está al mismo nivel que el cilindro de plástico que lo aloja. En la parte interior de dicho cilindro de plástico, en la cara interna de la lámina de metal, se coloca normalmente una resistencia construida con carbón en polvo prensado. La impedancia típica de este carbón en polvo suele ser inferior a una decena de ohmios. A continuación de este carbón prensado, se coloca una varilla de latón preferiblemente para que, una vez asome por el extremo opuesto a la lámina de oro, a través del cilindro de plástico que lo aloja, pueda recibirse la señal eléctrica procedente de la enzima depositada sobre la lámina.

La lámina, preferiblemente de oro, tiene un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.

También se citan como estado de la técnica las Patentes GB2054859, US4224125 Y US 3770607.

El documento GB2054859 divulga un soporte de biosensor, que consta de:

- un cilindro (3) de material no-conductor de la electricidad, que dispone un orificio pasante coaxial con el eje del cilindro (3)
- una varilla de metal (4) dispuesta en dicho orificio (2) con su extremo superior al ras de la base superior del cilindro (3)
- una capa/lámina/recubrimiento de metal noble (4) dispuesta sobre dicha base superior

- un protector constituido por un film permeable de polipropileno (6) dispuesto sobre la capa/lámina/recubrimiento de metal noble (4).

Este tipo de soportes para la construcción de biosensores, tiene el inconveniente de que la señal eléctrica proveniente de la reacción química de la enzima es muy  
5 baja. Las pruebas hechas con enzimas, preferiblemente gluconasa, para la determinación del ácido glucónico, demostraron que para una lámina de 3mm de diámetro y 0,1 mm de espesor, la respuesta a la enzima era de apenas 5 nanoamperios.

Aumentando el diámetro de la lámina de oro a 5 mm de diámetro, apenas se  
10 incrementó la señal otros 2 nanoamperios.

El biosensor así construido, una vez introducido en el circuito electrónico potencióstático, presenta problemas de medición por la muy baja señal de respuesta eléctrica de la enzima y además, un aumento de la temperatura del medio acuoso donde se realiza la medición falsea los datos al variar  
15 aproximadamente 2 nanoamperios por cada grado centígrado. Esto obliga a mantener rigurosamente el medio acuoso a una temperatura lo más constante posible.

La presente invención soluciona este problema de respuesta baja de señal de la enzima en presencia de la sustancia química para la que se ha diseñado. De  
20 igual forma, es válido para cualquier sustancia enzimática, pues la alta respuesta a la señal procede principalmente de la forma en que está construido el soporte objeto de esta patente.

Las sustancias enzimáticas necesitan un metal noble o carbón, donde colocarse para dar una respuesta a la sustancia para la que se diseñó. Este soporte,  
25 preferentemente de oro, no puede conectarse directamente mediante un cable o varilla conductora de electricidad al circuito electrónico potencióstático. Se debe colocar una impedancia que, en los sensores comerciales hasta el momento, está realizado mediante carbón prensado. Este carbón tiene que estar en contacto directo a la lámina, principalmente de oro, y no puede colocarse una  
30 resistencia electrónica convencional. Pero como la lámina de oro donde se deposita la encima es perfectamente conductora de la electricidad, por lo que la

señal electrónica que produce la enzima es enmascarada frente a la alta señal parásita o de base generada por el circuito electrónico potencioestático.

El soporte de biosensor objeto del invento se caracteriza porque consta de:

- 5 a) un cilindro de material no-conductor de la electricidad, que dispone un orificio pasante coaxial con el eje del cilindro
- b) una varilla de metal, dispuesta en dicho orificio con su extremo superior al ras de la base superior del cilindro
- c) una capa/recubrimiento de metal noble, de entre 1 a 1000 nanómetros, dispuesta sobre dicha base superior
- 10 d) un protector de un material no-conductor de la electricidad, dispuesto sobre la capa/recubrimiento de metal noble en la zona de conjunción de dicha capa con la varilla de metal y recubriendo una superficie de diámetro mayor que el diámetro de la varilla.

15 La presente invención resuelve el problema de la baja señal que entrega la encima depositada sobre el soporte del biosensor a la presencia de la sustancia química para la que se diseñó. Además, reduce enormemente la señal parásita o de línea base generada por el circuito electrónico potencioestático. Debido a la topología aplicada para su manufacturado, el precio de fabricación es unas 300 veces menor que lo que hay en el mercado actualmente. La señal eléctrica que  
20 entrega la enzima es unas 30 veces superior a cualquier soporte actual para biosensores, pudiéndose aumentar de forma exponencial aumentando su diámetro.

El presente soporte para biosensores está orientado a un solo uso. Una vez agotada la función de la enzima, éste se desecha.

25 Para comprender mejor el objeto de la presente invención, se representa en los planos una forma preferente de realización práctica, susceptible de cambios accesorios que no desvirtúen su fundamento.

La figura 1 es una vista esquemática en alzado del biosensor objeto del invento.

La figura 2 es una vista en sección y muy ampliada de la zona de conjunción varilla (3) / capa de metal noble (4).

Se describe a continuación un ejemplo de realización práctica, no limitativa, del presente invento.

- 5 El soporte del biosensor comprende un cilindro (1) de plástico, preferiblemente policloruro de vinilo, con un orificio pasante (2) en su centro, haciendo de éste un tubo. El diámetro del cilindro (1) puede ser de cualquier diámetro ( $\varnothing_3$ ) pero es preferible 10 mm. En el orificio pasante (2) se introduce una varilla metálica (3), por ejemplo, acero inoxidable, cobre, latón, etc. (de latón preferiblemente) con el
- 10 único fin de transportar el flujo de electrones generado por las enzimas (e) que se colocarán sobre la base superior ( $1_1$ ) del cilindro de plástico (1) hasta el circuito electrónico potencioestático (no representado).

Dicha varilla de metal (3) debe ser de un diámetro ( $\varnothing_1$ ) mucho más pequeño que el diámetro del cilindro de plástico, preferiblemente de 3 mm ó menor  $\varnothing_1 \ll \varnothing_3$ .

- 15 El extremo superior ( $3_1$ ) de esta varilla de latón (3) se deja al ras del cilindro de plástico (1) y por el otro extremo ( $3_2$ ) de deja asomar unos 5 mm o cualquier otra medida para su posterior amarre al circuito electrónico potencioestático.

- La zona del cilindro de plástico (1) donde la varilla de latón (3) se ha dejado al ras está refrendada/pulida. Para ello se empleará preferiblemente una máquina
- 20 herramienta tal como un torno de revolución a baja velocidad para no fundir el cilindro de plástico con la fricción. La superficie así pulida debe quedar lo más lisa posible y sin quemar el plástico en el mecanizado debido a un exceso de velocidad de la máquina herramienta de torneado o pulido.

- A su vez, en el cilindro de plástico (1) en su superficie lateral (10) y a una
- 25 distancia preferiblemente de 2 mm desde el borde superior de la zona pulida, se practica una hendidura (7) en forma toroidal a modo de sujeción futura de una junta (8) de goma tórica para amarrar una membrana (6) permeable u osmótica como las utilizadas en diálisis.

Una vez torneado y preparado el soporte del biosensor, se le da una capa de oro de entre 1 y 1000 nanómetros, siendo preferiblemente de entre 30 y 100 nanómetros, en función del comportamiento de otras enzimas en cuanto a la respuesta de generación del flujo de electrones o corriente eléctrica frente a la presencia de la sustancia para la que ha sido diseñada. Este baño de oro se aplica mediante sputtering a través de un equipo comercial para tal fin.

Mediante este recubrimiento se hace conductora de electricidad toda la zona pulida del cilindro de plástico (1) más la varilla de latón (3).

Este oro, al ser una capa tan delgada, del orden de nanómetros, presenta una impedancia al paso de la corriente eléctrica que puede ser de unos 10 ohmios desde la periferia hasta su centro.

La zona bañada de oro problemática es la del centro del cilindro de plástico (1), justo la zona donde está la varilla de latón (3) alojada. Si la enzima (e) depositada sobre el oro toca esta zona, producirá una señal residual base o parásita no deseada del orden de unas 50 ó 100 veces la señal que produciría la enzima (e) a la presencia de la sustancia para la que se diseñó, dando como resultado un funcionamiento muy anómalo. La señal eléctrica producida por la enzima sería enmascarada por esta señal parásita.

Para evitar la exposición de la enzima (e) a la zona central donde está la varilla de latón (3) bajo el recubrimiento de oro (4), se deposita un protector, pegamento o una pequeña gota (5) de resina epoxídica preferiblemente, pudiendo ser cualquier otra sustancia no conductora adherente al material del cilindro o incluso un tapón diseñado para tal fin. De esta forma, la enzima solo se depositará en toda la corona pulida del cilindro de plástico (1) bañado de oro (4) excepto en su zona central cubierta por una gota (5) de resina epoxídica preferiblemente.

La gota o protector (5) preferentemente, será de un material adherente al oro.

La enzima (e) depositada sobre este soporte objeto de patente, se recubre mediante una membrana (6) permeable u osmótica como las usadas en diálisis, y se amarra al lateral del cilindro de plástico (1) mediante una junta tórica (8) de

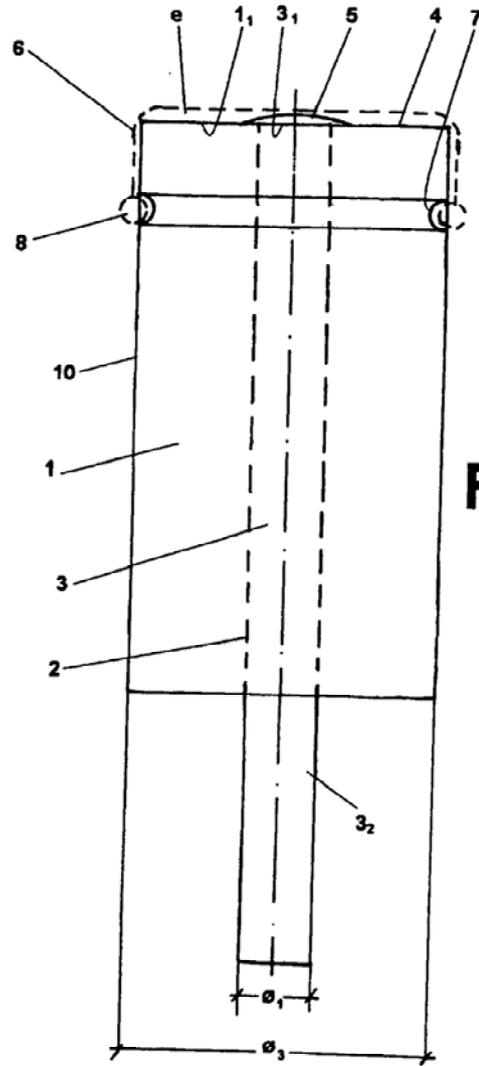
goma que a su vez se encaja en el rebaje lateral (7) en forma tórica que se practicó en el cilindro de plástico (1) que forma el soporte del biosensor. La membrana permeable (6) debe quedar perfectamente apretada contra la cara pulida (1<sub>1</sub>) del cilindro de plástico (1) para inmovilizar así la enzima (e) y obligarla a permanecer lo más cerca posible de la zona bañada de oro preferiblemente.

Sin medios de sujeción/apriete de la membrana (6) como por ejemplo este rebaje para la colocación de la junta tórica (8), la membrana permeable (6) podría moverse y hacer que el biosensor así diseñado no funcione correctamente al no obligar a la enzima (e) a permanecer lo más próxima a la zona bañada de oro.

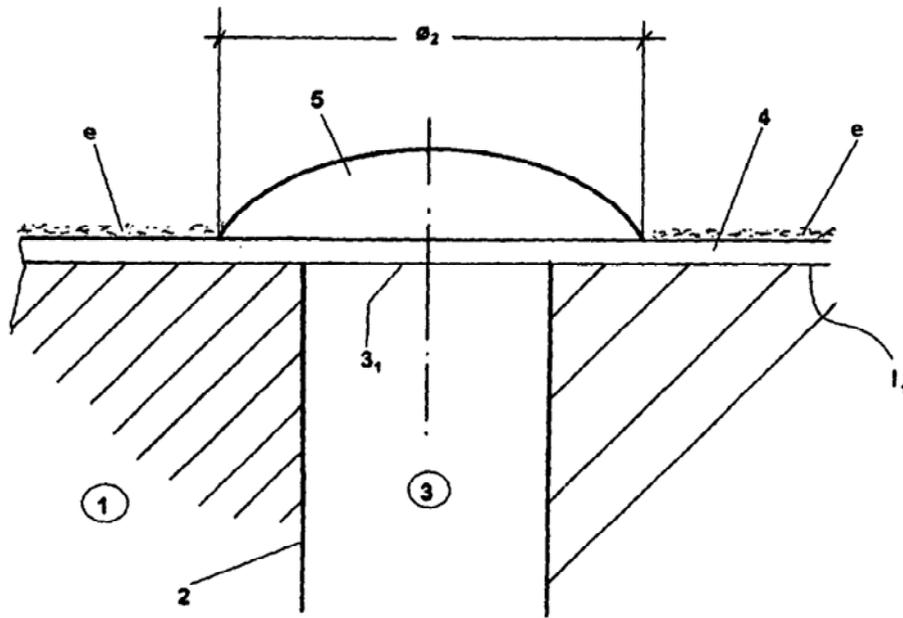
10 También podría sustituirse la membrana permeable (6) por una membrana permeable líquida.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Soporte de biosensor, que consta de:
- a) un cilindro (1) de material no-conductor de la electricidad, que dispone un orificio (2) pasante coaxial con el eje del cilindro (1)
  - 5 b) una varilla de metal (3) dispuesta en dicho orificio (2) con su extremo superior (3<sub>1</sub>) al ras de la base superior (1<sub>1</sub>) del cilindro (1)
  - c) una capa/recubrimiento de metal noble (4), de entre 1 a 1000 nanómetros, dispuesta sobre dicha base superior (1<sub>1</sub>)
  - 10 d) un protector (5) de un material no-conductor de la electricidad, adherente al oro y dispuesto sobre la capa/recubrimiento de metal noble (4) en la zona de conjunción de dicha capa (4) con la varilla de metal (3) y recubriendo una superficie de diámetro ( $\varnothing_2$ ) mayor que el diámetro de la varilla (3) de modo que la enzima se deposite sobre toda la capa de metal noble (4) excepto en su zona central cubierta por el protector (5).
- 15 2.- Soporte de biosensor, según reivindicación 1, caracterizado porque el cilindro (1) de material no-conductor dispone en su superficie lateral (10) de medios de sujeción de una membrana (6).
- 3.- Soporte de biosensor, según reivindicación 1, caracterizado porque la capa/recubrimiento (4) es de oro con un espesor de entre 30 y 100 nanómetros.
- 20 4.- Soporte de biosensor, según reivindicación 2, caracterizado porque la membrana 6 puede ser una membrana permeable o una membrana permeable líquida.
- 5.- Soporte de biosensor, según reivindicación 1, caracterizado porque el protector (5) es una gota de una resina adherente a la capa/recubrimiento de metal noble (4).
- 25



**Fig. 1**



**Fig. 2**

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante quiere únicamente ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto un gran cuidado en su concepción, no se pueden excluir errores u omisiones y la*  
5 *OEB declina toda responsabilidad a este respecto.*

### Documentos de patente que se citan en la descripción

- GB 2054859 [0004] [0005]
- US 3770607 A [0004]
- US 4224125 A [0004]