

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 612**

51 Int. Cl.:

G01N 21/45 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/FR2011/051613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12004536**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11743307 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2591336**

54 Título: **Dispositivo colorimétrico para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés**

30 Prioridad:

07.07.2010 FR 1055529

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

13.10.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)
145, Rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CATHALA, BERNARD y
CERCLIER, CAROLE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 637 612 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

Dispositivo colorimétrico para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés, ventajosamente del tipo biopolímero.

Estado de la técnica

10 En numerosos campos técnicos e industriales, la identificación y el estudio de enzimas que tienen una actividad hidrolítica frente a polímeros constituyen un reto principal.

15 Por ejemplo, tales enzimas hidrolíticas constituyen una herramienta esencial para generar biocarburantes a partir de la biomasa rica en elementos lignocelulósicos.

20 Más precisamente, la pared vegetal es una estructura compleja formada por polímeros enredados (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, etc.); las enzimas hidrolíticas se emplean ventajosamente para romper las cadenas celulósicas para dar azúcares destinados a fermentarse con el fin de crear bioetanol.

Para ello, resulta interesante emplear dispositivos técnicos que permiten la detección, de manera rápida, sencilla y fiable, de la actividad hidrolítica de una enzima de interés, o de una combinación de enzimas de interés, frente a un polímero o una combinación de polímeros.

25 En particular, resulta habitual poner en práctica dispositivos colorimétricos dedicados, que usan reacciones químicas para detectar la actividad enzimática. Estos dispositivos colorimétricos químicos emplean para ello colorantes o indicadores químicos de detección.

30 Por ejemplo, un método químico usado de manera clásica para la valoración de las actividades de polisacáridos hidrolasas se conoce con la denominación de "método de Nelson" (descrito concretamente en Nelson *et al.*, J. Biol. Chem. 1944, 153, 375-380).

35 Por tanto, con frecuencia, los dispositivos colorimétricos, para la detección de la actividad hidrolítica frente a uno o varios polímeros, son complejos de emplear, requieren numerosas manipulaciones y reactivos, y obligan generalmente a emplear un dispositivo de lectura (por ejemplo, un espectroscopio).

Para detectar la presencia de un analito en un medio de interés, determinados dispositivos colorimétricos usan un fenómeno óptico bien conocido: la interferencia.

40 Estos dispositivos comprenden para ello al menos una película transparente delgada o una capa transparente delgada, conectada sobre un sustrato de soporte.

45 El grosor de esta película transparente delgada está comprendido en un intervalo de valores que permiten la aparición de un color particular debido al fenómeno óptico de interferencia, también denominado "color interferencial" o "color de interferencia".

50 Este fenómeno se explica por el hecho de que una parte del rayo incidente se refleja sobre la superficie de contacto aire/película delgada, mientras que otra parte del rayo incidente se refracta y después se refleja sobre la segunda superficie de contacto película delgada/sustrato.

Los rayos reflejados interactúan para crear un fenómeno óptico de interferencia, que consiste en combinaciones entre de las ondas luminosas que son o bien interferencias constructivas o bien interferencias destructivas.

55 El color resultante corresponde a la longitud de onda en la que el fenómeno de interferencias constructivas es máximo.

Un dispositivo de este tipo se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-2004/031760, previsto en particular para detectar vapores orgánicos.

60 El dispositivo correspondiente comprende para ello tres capas superpuestas: - un sustrato reflector, - una capa de detección adecuada para adsorber el analito y para cambiar de grosor óptico durante la exposición al analito, y - una capa superior semirreflectante.

65 En la práctica, el analito de interés se fija sobre la capa de detección mediante adsorción, tras haber atravesado el sustrato reflector por porosidad. Este fenómeno conlleva una modificación del grosor de esta capa de detección, y por consiguiente una modificación de su color interferencial.

Un dispositivo de este tipo permite una detección de un analito, debido a la fijación de este último sobre la capa de detección; este dispositivo, y su procedimiento de puesta en práctica, sólo permiten una detección del tipo analítico.

5 El dispositivo según el documento WO-A-2004/031760 no se refiere de ningún modo a detectar los analitos en función de sus actividades biológicas.

Además, este dispositivo de la técnica anterior no está previsto de ningún modo, ni siquiera adaptado, para la puesta en práctica de una detección funcional de una actividad enzimática en el interior de una disolución de interés. En particular, la capa superior semirreflectante es susceptible de constituir un obstáculo para la eliminación de la capa de detección, en particular por aclarado, que se degradará por una enzima.

10 Por consiguiente, existe una necesidad de tales dispositivos colorimétricos, que emplean un fenómeno óptico de interferencia sobre capa delgada de detección, que sean adecuados para detectar, en una disolución acuosa de interés, una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés.

El documento US-A-2010/068749 describe un dispositivo colorimétrico de este tipo, para analizar la antigüedad y/o la calidad de determinados productos naturales, por ejemplo de productos alimenticios.

20 Este dispositivo colorimétrico está constituido por una superposición de capas, a saber un soporte, un reflector, una capa de polímero biodegradable y un espejo.

Este dispositivo colorimétrico está configurado de tal manera que un cambio del grosor de la capa de polímero biodegradable da lugar a un cambio de color visible a simple vista, que traduce de este modo la presencia de una actividad enzimática.

30 Para ello, la capa de polímero biodegradable está constituida por un polímero que puede degradarse mediante biomoléculas, concretamente enzimas o metabolitos catalíticos; por su parte, el espejo consiste en una capa de nanopartículas.

No obstante, este dispositivo colorimétrico no es totalmente satisfactorio; y esta superposición particular de capas, en particular la presencia de la capa de espejo a base de nanopartículas, es relativamente compleja de fabricar.

Sumario de la invención

35 En este contexto, el solicitante ha desarrollado un dispositivo colorimétrico que permite la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés, de manera sencilla, rápida y particularmente sensible.

40 Para ello, el dispositivo según la invención se basa en el uso de una capa transparente delgada (o película transparente delgada), que constituye un filtro de interferencia, para la detección de una actividad enzimática.

45 Esta capa de detección es adecuada para producir un color interferencial que se modifica, que aparece o que desaparece, según el caso, durante la exposición a una disolución acuosa que comprende la actividad enzimática hidrolítica buscada.

50 Para ello, el dispositivo colorimétrico según la invención está caracterizado porque comprende (i) un sustrato delimitado al menos por una superficie superior, y (ii) una capa transparente de detección, que tiene un primer grosor e y que comprende dicho polímero de interés.

55 La capa transparente de detección comprende, por un lado, una superficie superior, sobre la que está destinada a aplicarse dicha disolución acuosa de interés y que forma una primera superficie de contacto aire/capa de detección y, por otro lado, una superficie inferior, formada sobre dicha superficie superior del sustrato y que forman en conjunto una segunda superficie de contacto capa de detección/sustrato. Dichas dos superficies de contacto son adecuadas para generar un fenómeno óptico de reflexión.

60 La capa de detección está adaptada para, por un lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando carece de dicha actividad enzimática hidrolítica, conservar dicho primer grosor e y, por otro lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, presentar un segundo grosor e' , inferior a dicho primer grosor e .

65 Y dicho primer grosor e y/o dicho segundo grosor e' de dicha capa transparente de detección están adaptados para producir un color mediante un fenómeno óptico de interferencia generado mediante la recombinación de los haces luminosos reflejados en dichas superficies de contacto aire/capa de detección y capa de detección/sustrato.

Según una forma de realización preferida, el primer grosor e de la capa de detección se elige para producir un

primer color mediante un fenómeno óptico de interferencia; y la capa de detección está adaptada para, por un lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando carece de dicha actividad enzimática hidrolítica, conservar dicho primer grosor e que produce dicho primer color y, por otro lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, presentar un segundo grosor e' , inferior a dicho primer grosor e , que produce o bien un segundo color mediante un fenómeno óptico de interferencia, diferente de dicho primer color, o bien la desaparición de dicho primer color.

Otras características ventajosas de la invención, que pueden tomarse en combinación o independientemente unas de otras, se precisan a continuación:

- el primer grosor e de la capa transparente de detección es un grosor uniforme, elegido de un intervalo de grosor que va de 70 a 900 nm, y preferiblemente entre 75 y 250 nm;

- el primer grosor e y/o el segundo grosor e' de dicha capa transparente de detección están adaptados para producir un color mediante un fenómeno óptico de interferencia, con una reflectancia máxima para una longitud de onda comprendida entre 380 nm y 780 nm, y preferiblemente entre 400 nm y 700 nm;

- la capa transparente de detección tiene un índice de refracción n_c comprendido entre 1,2 y 1,7, y preferiblemente comprendido entre 1,4 y 1,6;

- el polímero contenido en la capa superior de detección se elige de los biopolímeros, es decir, ventajosamente los oligosacáridos, los polisacáridos, los péptidos, las proteínas, las ligninas, los ácidos nucleicos, la cutina y/o la suberina.

Según un modo de realización particular, el sustrato es transparente, y la capa transparente de detección tiene un índice de refracción n_c que es diferente del índice de refracción n_s del sustrato. En este caso, el índice de refracción n_s del sustrato es ventajosamente superior al índice de refracción n_c de la capa transparente de detección.

Según un modo de realización alternativo, el sustrato es opaco y comprende una superficie superior reflectante.

Según otra característica de realización, el polímero contenido en la capa transparente de detección está ventajosamente inmovilizado, para resistir a la aplicación de la disolución de interés carente de actividad enzimática.

En este caso, la capa superior de detección contiene ventajosamente nanocristales que forman redes de enlaces de hidrógeno ("cornificación") con el polímero de interés.

Preferiblemente, los nanocristales consisten ventajosamente en nanocristales de polisacáridos, y preferiblemente en nanocristales de celulosa.

Los nanocristales correspondientes tienen ventajosamente una carga de superficie negativa. Y la capa transparente de detección está constituida por al menos dos primeras subcapas que contienen cada una el polímero de interés; dichas primeras subcapas están separadas de dos en dos por una subcapa intercalada que contiene un compuesto policatiónico.

Según una forma de realización particular, la capa transparente de detección está constituida por al menos un par de dos subcapas (preferiblemente al menos dos pares de dos subcapas superpuestas) que contienen cada una al menos un polímero de interés, comprendiendo una primera subcapa un primer o varios primeros polímeros de interés (ventajosamente los nanocristales de polisacáridos), y conteniendo una segunda subcapa un segundo o varios segundos polímeros de interés.

Todavía en este caso, y de manera alternativa, la capa transparente de detección contiene ventajosamente una resina que forma redes de enlaces covalentes con el polímero de interés.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés.

Este procedimiento está caracterizado porque comprende al menos la sucesión de las siguientes etapas:

- proporcionar un dispositivo colorimétrico tal como se definió anteriormente,

- aplicar dicha disolución acuosa de interés sobre la superficie superior de la capa transparente de detección,

- lavar dicha superficie superior de la capa transparente de detección, para eliminar la disolución acuosa de interés,

- secar dicha capa transparente de detección, y

- analizar el color de dicha capa transparente de detección a nivel del sitio de aplicación de dicha disolución de interés.

5 La presente invención se refiere además al uso de un dispositivo colorimétrico tal como se definió anteriormente, para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés.

Descripción de las figuras

10 La presente invención se ilustra adicionalmente, sin limitarse de ningún modo, mediante la siguiente descripción con relación a las figuras adjuntas.

La figura 1 representa, de manera esquemática y visto de lado, un dispositivo colorimétrico según la invención, antes de la aplicación de la disolución acuosa de interés.

15 La figura 2 representa el dispositivo colorimétrico según la figura 1, tras la aplicación de una disolución acuosa de interés que comprende una actividad enzimática hidrolítica.

20 La figura 3 representa, de manera esquemática y visto de lado, un dispositivo colorimétrico que comprende una capa delgada de detección compuesta por varias subcapas, antes de la aplicación de la disolución acuosa de interés.

La figura 4 representa el dispositivo colorimétrico según la figura 3, tras la aplicación de una disolución acuosa de interés que comprende una actividad enzimática hidrolítica.

25 La figura 5 representa las curvas de interferencia, antes (trazo discontinuo) y después (trazo continuo) de la degradación, para una capa de detección a base de celulosa y de xiloglucano; estas curvas corresponden a la reflectancia, función de la longitud de onda en nm.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere por tanto a un dispositivo colorimétrico para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés.

35 Por “detección” se entiende la distinción entre la presencia y la ausencia de la actividad enzimática hidrolítica en la disolución acuosa de interés.

De manera alternativa o complementaria, la “detección” de la actividad enzimática hidrolítica consiste en determinar un valor cuantitativo de actividad enzimática en la disolución acuosa de interés.

40 Este “valor cuantitativo” puede expresarse en katal (kat), es decir, la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato por segundo.

Este “valor cuantitativo” también puede expresarse:

45 - en “unidad internacional” (UI), correspondiente a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto,

50 - en “número de rotaciones” (kcat), que es el número de moléculas de sustrato transformadas por molécula de enzima por segundo (o el número de moles de sustrato transformados por mol de enzima),

- en “actividad molar” que es el número de moles de sustrato transformados por mol de enzima por minuto,

55 - en “actividad específica”, es decir, la actividad por mg de proteína de enzima, expresada en UI/mg de proteína de enzima (o μ kat/mg).

Por “detección” también se entiende la distinción entre la presencia y la ausencia de una enzima activa que comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, en la disolución acuosa de interés.

60 Por “actividad enzimática hidrolítica” se entiende un mecanismo puesto en práctica por una enzima de tipo hidrolasa, que cataliza una reacción bioquímica de hidrólisis.

Las enzimas adecuadas para poner en práctica tales reacciones de hidrólisis se clasifican en particular en el grupo EC 3 de la nomenclatura designada “EC” (por “Enzyme Commission numbers” - “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)”).

65 Entre las enzimas de tipo hidrolasa pueden mencionarse, en particular, las enzimas que tienen una actividad

hidrolítica frente a los biopolímeros.

5 Entre estas enzimas adecuadas para hidrolizar biopolímeros pueden mencionarse, en particular, las polisacáridos hidrolasas, también denominadas glicósido hidrolasas o glicosidasas (estas enzimas se clasifican ventajosamente en el grupo EC 3.2.1).

Por "polisacáridos hidrolasas" se entienden, por ejemplo, las xilanasas, las celulasas, las quitinasas, las pectinasas, las manasas y Cellulyve (marca registrada).

10 Entre las enzimas hidrolíticas de biopolímeros también pueden mencionarse, por ejemplo, las proteasas, las nucleasas, las lignininasas.

15 La "disolución acuosa de interés" consiste en una fase líquida que contiene varias especies químicas, a saber al menos (i) un disolvente constituido principalmente por agua, preferiblemente en su totalidad por agua, y (ii) uno o varios compuestos en disolución o en suspensión, denominados "solutos".

Al menos uno de dichos compuestos en disolución o en suspensión consiste en una enzima activa adecuada para generar dicha actividad enzimática hidrolítica, para las disoluciones acuosas que comprenden dicha actividad.

20 A continuación se presentan ejemplos de polímeros frente a los que se busca la actividad enzimática.

En la figura 1 se representa esquemáticamente el dispositivo 1 colorimétrico según la invención.

25 Este dispositivo 1 colorimétrico comprende dos capas superpuestas, a saber (i) un sustrato 2, que sirve de soporte y delimitado por una superficie 2a superior, y (ii) una capa 3 transparente de detección, que comprende el polímero de interés y que presenta un índice de refracción designado "n_c".

30 De manera general, en la presente descripción, los índices de refracción facilitados se entienden para una temperatura de 20°C y para una longitud de onda de 520 nm.

La capa 3 transparente de detección está delimitada por dos superficies opuestas: (i) una superficie 3a superior, sobre la que está destinada a aplicarse dicha o dichas disoluciones acuosas de interés, y (ii) una superficie 3b inferior, formada sobre dicha superficie 2a superior del sustrato 2.

35 La superficie 3a superior de la capa 3 transparente de detección está libre, en el sentido de que no está recubierta de ningún modo por una capa adicional (por ejemplo, una capa de nanopartículas).

40 La distancia entre estas dos superficies 3a y 3b de la capa 3 de detección define el grosor de dicha capa 3 transparente de detección. Esta capa 3 transparente de detección comprende inicialmente un primer grosor, designado "e" (figura 1).

Estas capas 2 y 3 forman en conjunto dos superficies de contacto ópticas, a nivel respectivamente de la superficie 3a superior y de la superficie 3b inferior de la capa 3 de detección, a saber:

- 45 - una primera superficie 4 de contacto, situada entre el aire y la capa 3 de detección (que constituye un dioptrio), y
- una segunda superficie 5 de contacto, entre la capa 3 de detección y el sustrato 2.

50 Según la invención, la capa 3 transparente de detección está adaptada para permitir la detección de una actividad enzimática hidrolítica, frente al o a los polímeros de interés, en una disolución acuosa estudiada. Esta capa 3 de detección constituye un medio para la traducción de dicha actividad enzimática hidrolítica detectada, en una señal óptica.

55 Para ello, la capa 3 transparente de detección está adaptada para, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando carece de dicha actividad enzimática hidrolítica, conservar dicho primer grosor e (figura 1). Esta misma capa 3 transparente de detección también está adaptada para, tras la aplicación de la disolución acuosa de interés cuando comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, presentar un segundo grosor e', inferior a dicho primer grosor e (figura 2).

60 Por tanto, la presencia de una actividad enzimática hidrolítica en la disolución acuosa de interés es adecuada para provocar una reducción del grosor de la capa 3 de detección (desde el primer grosor e hasta el segundo grosor e'), que da lugar a un cambio de la coloración observable (directamente por un operario o por medio de un dispositivo apropiado) a nivel de esta capa 3 transparente de detección.

65 Para ello, el primer grosor e de la capa 3 transparente de detección y/o el segundo grosor e' de la capa 3 transparente de detección son adecuados para producir un color mediante un fenómeno óptico de interferencia.

Tal como se desarrolla a continuación, estas características del dispositivo 1 permiten la observación de un cambio óptico a nivel de la capa 3 de detección en presencia de una actividad enzimática de interés.

5 Este cambio óptico consiste ventajosamente en uno de los siguientes fenómenos:

(i) el paso de un primer color interferencial a un segundo color interferencial, o

(ii) la aparición de un color interferencial, o

10

(iii) la desaparición de un color interferencial.

En efecto, la capa 3 transparente de detección interviene como filtro de interferencia. En función de su grosor e o e' , la capa 3 transparente de detección comprende un color debido a fenómenos ópticos de reflexiones y de interferencias (constructivas/destructivas) para longitudes de onda particulares, ventajosamente en el dominio visible.

15

Más precisamente, cuando la luz encuentra la primera superficie 4 de contacto (aire/capa 3 de detección), una parte del haz se refleja. La otra parte de la luz se transmite a través de la capa 3 de detección, para reflejarse sobre la segunda superficie 5 de contacto (capa 3 de detección/sustrato 2).

20

El rayo reflejado sobre la segunda superficie 5 de contacto recorre una distancia más grande, provocando un desfase de la luz. Cuando la distancia recorrida es del orden de magnitud de la mitad de la longitud de onda de la luz incidente, la recombinación de los haces reflejados provoca una interferencia que conduce a la aparición de un color a nivel de la capa 3 de detección.

25

Por tanto, se hablará indistintamente del "color de interferencia" o del "color interferencial", que puede observarse a nivel de la capa 3 de detección.

30

Por "color" de la capa 3 de detección, en particular de un color interferencial, se entiende un color percibido (de manera ventajosa directamente por un individuo, a "simple vista") que presenta (i) una tonalidad cromática (la tonalidad cromática caracteriza el propio color, es decir, rojo, verde, amarillo, azul, etc.) y/o (ii) una claridad y/o (iii) una saturación.

35

Por "color", en particular un color interferencial, se entiende además la longitud de onda a la que el fenómeno de interferencias constructivas es máximo; este color también corresponde eventualmente a la longitud de onda a la que la curva de reflectancia es máxima, ventajosamente en el dominio del visible; este color también puede definirse por su curva espectral (reflectancia en función de la longitud de onda).

40

La interferencia, y por consiguiente la aparición del color, está por tanto relacionada en sustancia (i) con el grosor de la capa 3 de detección y (ii) con los fenómenos de reflexión en las dos superficies 4, 5 que delimitan dicha capa 3 de detección. Este color no necesita ningún marcaje químico del polímero.

45

En la práctica y tal como se mencionó anteriormente, en función del primer grosor e y del segundo grosor e' de la capa 3 de detección, este cambio de coloración consiste ventajosamente en una aparición, en una desaparición o en una modificación del color interferencial a nivel de la capa 3 de detección.

Este "cambio de coloración" consiste entonces ventajosamente en un cambio de (i) la tonalidad cromática y/o (ii) la claridad y/o (iii) la saturación, observable directamente por un individuo.

50

Para completar, a continuación se presentan con más detalle diferentes aspectos del dispositivo 1 colorimétrico.

SUSTRATO

55

El sustrato 2 se realiza de un material adecuado (i) para constituir un soporte para la capa transparente de detección, y (ii) para garantizar una reflexión (total o parcial, y ventajosamente especular) de haces luminosos aplicados al dispositivo 1 colorimétrico.

60

Según un primer modo de realización, el sustrato 2 consiste en un material transparente, que comprende un índice de refracción designado " n_s ". Este material es ventajosamente del tipo medio lineal homogéneo isótropo.

El índice de refracción n_s de este sustrato 2 es diferente del índice de refracción n_c de la capa 3 transparente de detección. Por tanto, la segunda superficie 5 de contacto, entre la capa 3 de detección y el sustrato 2, constituye un dioptrio.

65

En particular, el material que constituye el sustrato 2 se elige con un índice de refracción n_s superior al índice de

refracción n_c de la capa 3 transparente de detección.

5 Por ejemplo, para una capa 3 superior de detección que comprende un índice de refracción n_c comprendido entre 1,2 y 1,7, el sustrato 2 consiste ventajosamente en una oblea de silicio (habitualmente denominada "wafer") con un índice de refracción comprendido entre 3 y 5.

10 De manera general, cuanto más elevada es la diferencia entre los índices de refracción n_c/n_s de esta superficie 5 de contacto (entre la capa 3 de detección y el sustrato 2), más elevado es el coeficiente de reflexión (porcentaje de luz reflejada).

Según un segundo modo de realización, el sustrato 2 consiste en un material opaco que comprende una superficie 2a superior que presenta propiedades reflectantes.

15 Por "reflectante" se entiende en este caso una reflexión óptica total o al menos semirreflectante.

Los materiales adaptados para obtener una superficie 2a superior reflectante de este tipo incluyen los elementos químicos metálicos tales como aluminio, cromo, oro, níquel, silicio, plata o su mezcla. Otros materiales adaptados incluyen los óxidos metálicos, tales como el óxido de cromo y el óxido de titanio.

20 De manera general, e independientemente del modo de realización, el coeficiente de reflexión a nivel de la segunda superficie 5 de contacto es por ejemplo de al menos el 20%, eventualmente comprendido entre el 20% y el 90%, y eventualmente superior al 90%.

CAPA TRANSPARENTE DE DETECCIÓN

25 La capa 3 de detección comprende al menos un polímero de interés, es decir un único polímero o una combinación de polímeros.

Por "polímero" se abarcan tanto los copolímeros como los homopolímeros.

30 El polímero se elige ventajosamente de los biopolímeros, o dicho de otro modo, los "polímeros orgánicos", es decir los polímeros procedentes de una estructura biológica.

A título indicativo, estos polímeros pueden elegirse de:

- 35
- los oligosacáridos y polisacáridos (celulosa, xilano, pectina, quitosano, quitina, xiloglucano, arabinosilano, etc.),
 - péptidos y proteínas (albúmina sérica bobina o humana, glutenina, etc.),
 - 40 - los ácidos nucleicos, concretamente los ácidos desoxirribonucleicos, los ácidos ribonucleicos, etc.,
 - la cutina, la suberina y la lignina.

45 Tales biopolímeros pueden presentarse en una forma aislada (es decir, cadenas de polímeros diferenciadas), agregada (es decir, cadenas de polímeros enmarañadas) o cristalizada (es decir, cadenas de polímeros organizadas según un motivo de repetición ordenado).

50 La capa 3 de detección comprende un índice de refracción n_c que está ventajosamente comprendido entre 1,2 y 1,7, y preferiblemente comprendido adicionalmente entre 1,4 y 1,6.

La superficie 3a superior y la superficie 3b inferior de la capa 3 de detección son paralelas, o al menos aproximadamente paralelas, entre sí.

55 Estas dos superficies 3a y 3b son preferiblemente planas, o al menos aproximadamente planas.

Tal como se mencionó anteriormente, estas dos superficies 3a y 3b definen el primer grosor e , que consiste ventajosamente en un grosor uniforme o constante por toda la superficie.

60 Este primer grosor e se elige ventajosamente de un intervalo comprendido entre 70 y 900 nm, y más preferiblemente comprendido entre 75 y 250 nm.

Tal como se indicó anteriormente, la capa 3 transparente de detección es adecuada para conservar dicho primer grosor e durante la aplicación de una disolución carente de dicha actividad enzimática.

65 Para ello, el o los polímeros de interés están ventajosamente inmovilizados.

Esta inmovilización puede generarse mediante enlaces (i) de tipo covalentes o “químicos” (reticulación) y/o (ii) de tipo no covalentes o “físicos” (electrostáticos, de hidrógeno, de fuerza de de Van der Waals).

5 En el caso (i) anterior, la capa 3 superior de detección contiene ventajosamente una resina que forma redes de enlace covalente con el o los polímeros de interés.

Esta resina se elige en función del o de los polímeros que van a reticularse.

10 Para la elección y la puesta en práctica de una resina de este tipo, puede hacerse referencia, por ejemplo, al siguiente documento: Ducéré *et al.*, 2005 (“A capacitive humidity sensor using cross-linked cellulose acetate butyrate” *Sensors and Actuators B: Chemical* 106 (1), 331-334 (2005)), Wu *et al.*, 2009 (“Molecularly imprinted organic-inorganic hybrid membranes for selective separation of phenylalanine isomers and its analogue” *Separation and Purification Technology* 68 (1), 97-104 (2009)), y Schuler *et al.*, 2001 (“Decomposable hollow biopolymer-based capsules” *Biomacromolecules* 2 (3), 921-926 (2001)).

15 Por ejemplo, la reticulación mediante resinas de melamina-urea-formaldehído (también denominadas “MUF”) presenta las siguientes ventajas:

20 - la reacción de reticulación puede tener lugar con numerosas funciones químicas (alcohol, amina, fenol), permitiendo así reticular un gran número de clases de biopolímeros;

- existen formulaciones de resina soluble en agua que permiten una puesta en práctica sencilla mediante un mezclado de la disolución antes de depositarse;

25 - la reticulación es sencilla: el monómero es estable a temperatura ambiente y reacciona cuando se lleva la película a 90°C en atmósfera seca durante una hora, siendo este tratamiento compatible con la mayoría de los biopolímeros.

En el caso (ii) anterior, la inmovilización puede obtenerse por medio de nanocristales que forman redes de enlaces de hidrógeno (también conocido con la denominación del fenómeno de “cornificación”) con el polímero de interés.

30 Para ello, los nanocristales consisten ventajosamente en compuestos que comprenden cargas electrostáticas negativas en la superficie. Para ello, pueden elegirse preferiblemente nanocristales de polisacáridos, y preferiblemente nanocristales de celulosa.

35 Tales nanocristales se preparan, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida del algodón según el protocolo descrito en Revol *et al.* (*Int. J. Biol. Macromol.* 1992, 14, 170-172) o Cranston *et al.* (*Biomacromolecules*, vol. 7, 2006, pág. 2522).

40 Por ejemplo, para estabilizar una capa 3 transparente de detección a base de xiloglucano, se añaden nanocristales de celulosa. Por su parte, una capa 3 transparente de detección a base de arabinosilano se fija ventajosamente con la ayuda de una resina de melamina-urea-formaldehído.

45 Por otro lado, la capa 3 de detección puede consistir en una única capa que forma un medio lineal homogéneo isótropo (o “MLHI”). En este caso, la capa 3 de detección está constituida ventajosamente por el o los polímeros de interés a lo largo de toda su altura.

De manera alternativa, la capa 3 transparente de detección puede estar constituida por varias subcapas superpuestas, conteniendo al menos una de dichas subcapas el o los polímeros de interés.

50 En este último caso, la subcapa que contiene el o los polímeros de interés constituye ventajosamente al menos la superficie 3a superior de la capa 3 de detección.

Las capas 3 de detección comprenden entonces ventajosamente al menos dos subcapas, más ventajosamente entre ocho y dieciséis subcapas.

55 En este contexto, la capa 3 de detección está constituida ventajosamente por varios pares de subcapas superpuestas, ventajosamente entre cuatro y ocho pares de subcapas superpuestas. Dichos pares de subcapas superpuestas son idénticos, o al menos aproximadamente idénticos, entre sí.

60 En el caso de una estructura de este tipo de varias subcapas, la capa 3 de detección puede comprender una alternancia de polímeros de interés, que forman los pares de subcapas superpuestas, con, por ejemplo, sucesivamente una subcapa de celulosa (ventajosamente en forma de nanocristales) y una subcapa de xiloglucano.

65 Según otro ejemplo, la capa 3 de detección puede comprender una alternancia de subcapas, que forman los pares de subcapas superpuestas, con, sucesivamente, una subcapa de polielectrolito (por ejemplo poli-L-lisina o “PLL”, o clorhidrato de polialilamina o “PAH”) y una subcapa que comprende el o los polímeros de interés (por ejemplo una

mezcla de celulosa y de xiloglucano).

La alternancia de subcapas permite en particular alcanzar el grosor deseado a nivel de la capa 3 de detección, tal como se desarrolla a continuación en el contexto del procedimiento de deposición.

5 Por otro lado, en el caso de un sustrato 2 y de una capa 3 de detección que comprenden una misma carga electrostática, la cara 2a superior del sustrato 2 está ventajosamente revestida de una subcapa de anclaje constituida por un polielectrolito (representado por ejemplo en la figura 3 y designado con la referencia 7b), para crear una superficie de contacto de enlace entre dicho sustrato 2 y dicha capa 3 de detección.

10 Por ejemplo, la subcapa de polielectrolito consiste en poli-L-lisina o clorhidrato de polialilamina. Este es ventajosamente el caso, por un lado, para un sustrato constituido por una oblea de silicio y, por otro lado, para una capa de detección o una subcapa que contiene nanocristales de celulosa, que tienen ambas cargas negativas.

15 PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN

La capa 3 transparente de detección se deposita sobre el sustrato 2 mediante una técnica apropiada, en una o varias etapas.

20 De manera general, existen diferentes técnicas para construir la capa 3 transparente de detección.

La técnica de recubrimiento por inmersión (o "dip-coating") consiste en sumergir el sustrato en una disolución de polímeros. Este método permite obtener capas muy finas, de algunos nanómetros.

25 Para poner en práctica esta técnica, puede hacerse referencia, por ejemplo, a los siguientes documentos: Jean *et al.*, 2008 ("Structural Details of Cellulose Nanocrystals/Polyelectrolytes Multilayers Probed by Neutron Reflectivity and AFM" *Langmuir* 24 (7), 3452-3458 (2008)), o Cranston *et al.*, 2006 ("Morphological and Optical Characterization of Polyelectrolyte Multilayers Incorporating Nanocrystalline Cellulose" *Biomacromolecules* 2006, 7, (9), 2522-2530).

30 La pulverización (o "spray-coating") consiste en pulverizar el polímero sobre el soporte. El disolvente se evapora en parte durante la pulverización y el resto se evapora tras haberse depositado. Esta técnica tiene el interés de ser más rápida que el recubrimiento por inmersión.

35 Esta técnica se describe, por ejemplo, en el documento Wagberg *et al.* "The Build-Up of Polyelectrolyte Multilayers of Microfibrillated Cellulose and Cationic Polyelectrolytes" *Langmuir* 24 (3), 784-795 (2008).

40 La centrifugadora de recubrimiento (también denominada recubridora por centrifugación o "spin-coating") consiste en depositar la disolución que contiene el polímero sobre el sustrato, preferiblemente en el centro de este último. El sustrato en rotación provoca el esparcimiento de la disolución depositada sobre su superficie y la evacuación del exceso de líquido, mediante centrifugación; el disolvente residual se evapora, dejando sólo el material sobre el sustrato. El grosor de la capa delgada obtenida varía con la velocidad de rotación, la viscosidad y/o la concentración de la disolución.

45 Esta última técnica se estudia, por ejemplo, en los documentos de Cranston *et al.*, "Morphological and Optical Characterization of Polyelectrolyte Multilayers Incorporating Nanocrystalline Cellulose" *Biomacromolecules* 2006, 7, (9), 2522-2530, o Cranston *et al.*, "Birefringence in Spin-Coated Films Containing Cellulose Nanocrystals" *Colloids and Surfaces A* 2008, 325, (1-2), 44-51.

50 En el contexto de esta última técnica, para ajustar el grosor de la capa o de las subcapas destinadas a constituir la capa 3 de detección, ventajosamente es posible hacer referencia, por ejemplo, a la siguiente fórmula (1), procedente de David *et al.*, "Spin Coating of Thin and Ultrathin Polymer Films" *Polymer engineering and science*, vol. 38, n.º 12, diciembre de 1998, pág. 2040, a saber:

$$(1) \quad h_f \propto \left(\frac{\eta_0}{\rho\omega} \right)^{1/2}$$

55 siendo

h_f : grosor de la capa

60 η_0 : viscosidad inicial de la disolución

ρ : densidad del líquido

ω : velocidad de rotación

este principio es válido en particular para los polielectrolitos, pero también se aplica para materiales que tienen otros tipos de interacciones entre sí.

5 En la práctica, la capa 3 de detección se deposita ventajosamente en varias etapas, para constituir una superposición de subcapas. Un procedimiento de este tipo se desarrolla, por ejemplo, en la parte de ejemplo a continuación.

10 Este enfoque permite optimizar la fabricación y la estabilidad de la capa 3 de detección. Un enfoque de este tipo también puede ser útil para introducir subcapas en su grosor, que tienen el objetivo de definir el grosor final e' de la capa 3 de detección, tras la acción enzimática.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

15 En la práctica, el procedimiento para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés, comprende al menos la sucesión de las siguientes etapas.

20 Tras proporcionar un dispositivo 1 colorimétrico tal como se definió anteriormente en relación con la figura 1, la disolución acuosa de interés se aplica sobre la superficie 3a superior de la capa 3 transparente de detección.

Esta disolución acuosa se deposita en forma de una gota, cuyo volumen está ventajosamente comprendido entre 20 μ l y 1 ml.

25 Entonces se incuba el dispositivo 1 colorimétrico durante un tiempo y en condiciones apropiados, concretamente en función de la actividad enzimática estudiada.

30 A continuación se lava la superficie 3a superior de la capa 3 transparente de detección, para eliminar la disolución acuosa de interés y para eliminar la parte de la capa de detección que ha experimentado eventualmente una hidrólisis enzimática.

Para ello se usa ventajosamente una disolución acuosa carente de actividad enzimática, por ejemplo agua o un tampón de disolución apropiado.

35 A continuación se procede a secar dicha capa 3 transparente de detección.

Para terminar, se analiza el color de la capa 3 transparente de detección, a nivel del sitio de aplicación de dicha disolución de interés.

40 Para ello, se orienta una fuente luminosa (o un haz luminoso) en dirección a la capa 3 transparente de detección.

Esta fuente de luz puede ser natural o artificial. Esta luz es ventajosamente del tipo policromática, y más preferiblemente del tipo de luz de espectro continuo.

45 Salvo que se estipule lo contrario, el dispositivo 1 colorimétrico se observa según un ángulo normal a la superficie 2a superior del sustrato 2. Podrían usarse otros ángulos de visualización, por ejemplo inferiores a 30°, y más preferiblemente inferiores a 15°, con respecto a un eje perpendicular a la superficie 2a superior del sustrato 2.

50 Tal como se mencionó anteriormente, en ausencia de una actividad enzimática hidrolítica en la disolución acuosa de interés, la capa 3 transparente de detección conserva el grosor e inicial. Por tanto, no hay ningún cambio óptico a nivel de la capa 3 de detección.

55 En cambio, la presencia de una actividad enzimática hidrolítica en la disolución acuosa de interés conlleva una degradación de la capa 3 transparente de detección, que da lugar a una disminución de su grosor.

En este caso, la capa 3 transparente de detección, inicialmente con un primer grosor e (figura 1), termina con un segundo grosor e' (figura 2) que es inferior a dicho primer grosor e .

60 Este segundo grosor e' está ventajosamente comprendido entre 0 (la capa 3 de detección se elimina) y 250 nm, y preferiblemente entre 70 y 250 nm.

Este cambio de grosor, del primer grosor e al segundo grosor e' , provoca entonces ventajosamente uno de los siguientes cambios ópticos:

65 (i) el paso de un primer color interferencial a un segundo color interferencial, siendo dichos colores interferenciales

diferentes uno de otro,

(ii) el paso de una ausencia de color interferencial a la aparición de un color interferencial, o

5 (iii) el paso de un color interferencial a la desaparición de dicho color interferencial.

La lectura del color de la capa 3 de detección puede realizarse (i) directamente por el operario o (ii) por medio de un sistema de lectura adaptado.

10 El cambio del color de la capa 3 transparente de detección se observa ventajosamente en el dominio de la luz visible, y por tanto puede detectarse directamente por un individuo, sin recurrir a un dispositivo de lectura.

En este caso, el primer grosor e y/o el segundo grosor e' de la capa 3 de detección se eligen de manera que se obtiene un color interferencial cuya reflectancia máxima se sitúa a una longitud de onda comprendida entre 380 nm y 780 nm, y preferiblemente comprendida entre 400 nm y 700 nm.

15 Más generalmente, el cambio óptico consiste ventajosamente en un cambio de la tonalidad cromática, lo que facilita la lectura y la interpretación de los resultados.

20 Para facilitar esta lectura directamente por un operario, también puede aplicarse una disolución acuosa testigo sobre la misma capa 3 de detección, en las proximidades del sitio de aplicación de la disolución acuosa de interés. Esta disolución acuosa testigo consiste ventajosamente en una disolución acuosa carente de la actividad enzimática (por ejemplo, mediante inactivación de la actividad enzimática, ventajosamente con calor).

25 Un color diferente entre el sitio de aplicación de la disolución de interés y el sitio de aplicación de la disolución acuosa testigo muestra la presencia de una actividad enzimática en dicha disolución de interés. Un color idéntico entre el sitio de aplicación de la disolución de interés y el sitio de "testigo" demuestra la ausencia de una actividad enzimática en la disolución de interés.

30 Si es necesario, pueden usarse dispositivos de lectura para observar un cambio del color de la capa transparente de detección, concretamente cuando se somete el dispositivo colorimétrico a otras fuentes de luz tales como las radiaciones ultravioletas (UV), las radiaciones infrarrojas o las radiaciones en el infrarrojo cercano.

35 Para ello, pueden usarse dispositivos de lectura para el análisis de los dispositivos 1 colorimétricos, por ejemplo fotodetectores, incluidos dispositivos de transferencia de carga (también denominados "Charge-coupled Device" o CCD), cámaras digitales, etc.

En este caso, el dispositivo 1 colorimétrico se emplea en un sistema colorimétrico automatizado que comprende ventajosamente un dispositivo de lectura óptico, una fuente luminosa y, opcionalmente, medios para analizar el cambio de color.

40 Entonces puede buscarse la actividad enzimática mediante una comparación de los colores obtenidos (i) por la disolución de interés y por una disolución "testigo" o (ii) antes y después de la aplicación de la disolución acuosa de interés.

45 Los dispositivos de lectura permiten entonces ventajosamente determinar el espectro de reflectancia visible a nivel de la capa 3 de detección. De manera ventajosa y a modo de ejemplo, puede considerarse que hay un cambio óptico cuando la longitud de onda de reflectancia máxima a nivel de dicha capa 3 de detección es diferente (i) entre la disolución de interés y la disolución "testigo" o (ii) antes y después de la aplicación de la disolución acuosa de interés.

50 Un color diferente antes y después de la aplicación de la disolución acuosa de interés muestra la presencia de una actividad enzimática en dicha disolución de interés. Un color idéntico, o aproximadamente idéntico, antes y después de la aplicación de la disolución acuosa de interés muestra la ausencia de una actividad enzimática en la disolución de interés.

55 Además, para determinar un valor cuantitativo de actividad enzimática en la disolución acuosa de interés, es suficiente con adaptar, por ejemplo, las diluciones de la disolución de interés y/o el tiempo de incubación y/o la estructura de la capa de detección. Por tanto, puede considerarse que el color final depende de dicho valor cuantitativo.

60 MODOS DE REALIZACIÓN PARTICULARES

Según un primer modo de realización correspondiente a la figura 1, la capa 3 transparente de detección está constituida ventajosamente por un medio lineal homogéneo isótropo (o "MLHI"), depositado en una o varias etapas.

65

En este caso, la disminución de grosor de la capa 3 de detección (del grosor e inicial en la figura 1 al grosor e' final en la figura 2) depende principalmente del tiempo de incubación.

5 De manera alternativa y tal como se representa en la figura 3, la capa 3 transparente de detección puede estar constituida por una superposición de cuatro subcapas 6 y 7:

- dos de las subcapas 6a y 6b comprenden cada una el o los polímeros de interés, ventajosamente inmovilizados mediante nanopartículas aniónicas, y

10 - otras dos de las subcapas 7a y 7b contienen cada una un compuesto policatiónico.

Cada subcapa 6, 7 constituye un medio lineal homogéneo isótropo (o "MLHI").

15 Estas subcapas 6 y 7 se depositan en alternancia, formando pares de subcapas 6a, 7a y 6b, 7b superpuestas, formando en particular una subcapa 6 de polímero(s) la superficie 3a superior de la capa 3 de detección.

Esta estructura tiene concretamente el objetivo de reducir las dificultades para obtener subcapas individuales gruesas; la alternancia de subcapas permite obtener el grosor e inicial deseado.

20 Por ejemplo, las subcapas 7 policatiónicas están constituidas por clorhidrato de polialilamina o de poli-L-lisina.

En este caso, la disminución de grosor de la capa 3 de detección (del grosor e inicial en la figura 3 al grosor e' final en la figura 4) depende ventajosamente de la subcapa 6a de polímero(s) que constituye la superficie 3a superior de la capa 3 de detección.

25 En otras palabras, la actividad enzimática hidrolítica garantiza preferiblemente una degradación total de la subcapa 6a de polímero(s) que constituye inicialmente la superficie 3a superior de la capa 3 de detección (tal como se representa en la figura 4). Tras esta acción enzimática, la superficie 3a superior de la capa 3 de detección está constituida por la superficie superior de la subcapa 7a policatiónica directamente subyacente.

30 Este modo de realización presenta el interés de permitir un control del grosor e inicial, y también del grosor e' final generado en presencia de una actividad enzimática.

35 De manera adicionalmente alternativa y según la figura 3, la capa 3 transparente de detección puede estar constituida por una superposición de subcapas 6 y 7:

- dos de las subcapas 6a y 6b comprenden cada una un primer o varios primeros polímeros de interés, y

40 - otras dos de las subcapas 7a y 7b contienen cada una un segundo o varios segundos polímeros de interés.

Estas subcapas 6 y 7 se depositan en alternancia, formando pares de subcapas 6a, 7a y 6b, 7b superpuestas.

Por ejemplo, el primer polímero de interés consiste en nanocristales de celulosa; y el segundo polímero de interés consiste en xiloglucano.

45 De manera general, el dispositivo colorimétrico según la invención puede por tanto adaptarse para la detección de actividades hidrolíticas con respecto a un polímero de interés.

50 Este dispositivo tiene como ventaja (i) no necesitar materiales complejos para su uso, (ii) presentar un gran potencial de miniaturización y (iii) poder integrarse en un sistema de análisis a alta velocidad.

También es interesante en cuanto a que puede emplearse en el contexto de una medición semicuantitativa de una actividad hidrolítica, adaptando concretamente el grosor de la capa de detección y el tiempo de reacción.

55 Por ejemplo, un procedimiento posible para una medición semicuantitativa de una actividad hidrolítica de este tipo en una disolución acuosa comprende ventajosamente las siguientes etapas:

60 - proporcionar un dispositivo colorimétrico según la invención, cuya capa transparente de detección está constituida por al menos un polímero de interés adecuado para experimentar una hidrólisis en presencia de dicha actividad hidrolítica,

- aplicar dicha disolución acuosa de interés sobre la superficie superior de la capa transparente de detección de dicho dispositivo colorimétrico,

65 - lavar dicha superficie superior de la capa transparente de detección,

- secar dicha capa transparente de detección, y

5 - analizar el color de dicha capa transparente de detección a nivel de dicho sitio de aplicación de dicha disolución de interés, en comparación con uno o varios sitios de testigo (por ejemplo un intervalo de calibración), para la evaluación semicuantitativa de la actividad hidrolítica en dicha disolución acuosa.

Este dispositivo colorimétrico según la invención también presenta el interés de poder permitir la identificación de una actividad hidrolítica específica con respecto a un polímero determinado.

10 Por ejemplo, un procedimiento concebible para identificar una actividad hidrolítica específica de este tipo en una disolución acuosa comprende ventajosamente las siguientes etapas:

15 - proporcionar un dispositivo colorimétrico según la invención, cuya capa transparente de detección está constituida por un polímero de interés adecuado para experimentar una hidrólisis en presencia de dicha actividad hidrolítica,

- aplicar dicha disolución acuosa de interés sobre la superficie superior de la capa transparente de detección de dicho dispositivo colorimétrico,

20 - lavar dicha superficie superior de la capa transparente de detección,

- secar dicha capa transparente de detección, y

25 - analizar el color de dicha capa transparente de detección a nivel de dicho sitio de aplicación de dicha disolución de interés, y

- comparar el color de dicho sitio de aplicación con un sitio de testigo, para determinar la presencia o la ausencia de dicha actividad hidrolítica,

30 - realizar la selección positiva de dicha disolución acuosa, o de la o las enzimas que contiene, si la comparación muestra que dicha disolución acuosa sometida a prueba modifica de manera conveniente el color de dicha capa transparente de detección.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos desarrollados a continuación.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Realización de una capa transparente de detección sobre un sustrato y estudio de su estabilidad

MATERIAL

40 Los diferentes productos usados son:

- arabinoxilano de trigo de alta viscosidad (AX-HV), 47 cSt (comercializado por Megazyme)

45 - arabinoxilano de trigo de media viscosidad (AX-MV), 22 cSt (comercializado por Megazyme)

- clorhidrato de polialilamina (PAH) (comercializado por SIGMA)

50 - nanocristales de celulosa (C) (también denominados con la denominación "whiskers") preparados mediante hidrólisis ácida del algodón según el protocolo descrito en Cranston *et al.* (Biomacromolecules, vol. 7, 2006, págs. 2522)

- xiloglucano (XG) extraído de la semilla de tamarindo (Silvestre Virginie, tesis 2004, Universidad de Nantes),

55 - una resina de melamina-formaldehído (MUF) Resimene AQ-7550 (comercializada por INEOS Melamines); esta resina se diluye previamente al 10% a partir de 640 µl de disolución comercial y completada hasta 5 ml con HCl a 10⁻² mol/l,

60 - una oblea de silicio (también denominada habitualmente con la denominación de "wafer") que comprende una superficie superior pulida.

MÉTODOS

1.1. Realización de las capas delgadas

65 1.1.1.- Construcción mediante centrifugadora de recubrimiento

Se limpia el soporte en una mezcla corrosiva compuesta por el 70% de ácido sulfúrico H_2SO_4 y el 30% de peróxido de hidrógeno H_2O_2 durante 30 minutos.

5 A continuación se aclara el soporte en dos baños de agua sucesivos y se seca con nitrógeno.

Se realizaron las capas mediante el dispositivo para recubrimiento por centrifugación Spin 150 NPP (SPS Europe) a una velocidad de rotación de 2000 rpm (para "revoluciones por minuto") con una aceleración idéntica para todos los ensayos de 1400 rpm por segundo.

10

1.1.2.- Capa de celulosa/xiloglucano

Las capas de celulosa/xiloglucano tienen el objetivo de detectar actividades celolíticas. En efecto, el xiloglucano y la celulosa son sensibles a las celulasas (tienen el mismo esqueleto).

15

Se coloca la oblea de silicio en el dispositivo para recubrimiento por centrifugación.

Se deposita el PAH (0,5 g/l) en el centro de una oblea de silicio y se deja en reposo durante 5 min.

20

Se pone la oblea de silicio en rotación durante 1 minuto a la velocidad elegida, después se aclara con agua durante 1 min.

A continuación, se deposita la disolución de celulosa/xiloglucano que contiene 5 g/l de nanocristales de celulosa y 5 g/l de xiloglucano en el centro, después se deja en reposo durante 5 min. El xiloglucano y los nanocristales de celulosa pueden establecer interacciones no covalentes, que permiten generar una red adecuada para inmovilizar la mezcla tras el secado.

25

A continuación se pone la oblea de silicio en rotación durante 3 min, después se aclara durante 3 min.

30

Se repiten estas etapas una segunda vez para obtener una película con dos pares de subcapas (una subcapa de PAH - una subcapa de una mezcla de celulosa/xiloglucano).

1.1.3.- Películas de arabinosilano (AX)

35

Se realizaron las películas de arabinosilano o bien con resina (10 y 15 g/l de AX) o bien sin resina (5, 10 y 15 g/l de AX).

Se realiza la preparación de una disolución de arabinosilano a 15 g/l con el 5% de resina, por ejemplo, de la siguiente manera: se toman 3,75 ml de arabinosilano a 20 g/l, a los que se les añaden 37,5 μ l de resina al 10%; se completa la mezcla hasta 5 ml con agua ultrapura. El volumen de resina añadido se modifica en función de la concentración deseada (5, 10, 15 y 20%).

40

Se realizan las disoluciones que contienen 10 g/l de arabinosilano a partir de disoluciones a 15 g/l según el principio descrito anteriormente.

45

En la práctica, se deposita la disolución de PAH en el centro de una oblea de silicio, y se deja durante 5 min en reposo. A continuación se pone la oblea de silicio en rotación durante 3 min, después se aclara con agua durante 3 min. Para terminar, se deposita la disolución de arabinosilano en el centro, se deja en reposo durante 5 min y se pone en rotación durante 3 min.

50

1.2.- Medición de los grosores mediante interferometría

Para medir el grosor de las superficies depositadas sobre las obleas de silicio, se usa un espectrofotómetro UV-visible Specord S600.

55

Se deposita la oblea de silicio sobre un soporte delante de dos espejos. Se refleja la luz sobre un primer espejo para transmitirse a continuación a la muestra, después se refleja hacia el segundo espejo y se retransmite al detector.

La medición del grosor de la película mediante la luz reflejada es una técnica bien establecida, basada en la interacción de la película con la luz. Depende de interferencias que resultan de una reflexión y de una transmisión parciales en las diferentes superficies de contacto.

60

Se registran los espectros a lo largo de todo el intervalo de longitudes de onda cubierto por el espectrofotómetro (de 182 nm a 1019 nm).

65

La adquisición de los espectros y el cálculo de los grosores de películas se realizan con el programa WinAspect.

1.3.- Pruebas de estabilidad

En primer lugar se sumerge la oblea de silicio, en la que se deposita el polímero, en el agua y después se seca.

En un segundo momento, se somete a prueba la resistencia de la capa de detección con la ayuda (i) de una solución salina para evaluar el efecto de la fuerza iónica (NaCl a 0,1 mol/l), y (ii) de disoluciones ácida y básica (HCl de pH 2 y NaOH de pH 12) para evaluar el efecto del pH.

Se deposita una gota de cada disolución sobre el sustrato y se deja durante tres minutos.

Se aclara el dispositivo con agua y después se seca.

Se toman fotografías de las capas de detección en cada etapa de la prueba de estabilidad.

RESULTADOS: ESTABILIDAD DE LAS CAPAS DE DETECCIÓN

Para poder ser eficaces, las capas delgadas deben ser homogéneas y estables en ausencia de enzima. También hace falta que las capas de detección puedan aclararse con agua y sean estables frente a las disoluciones acuosas estudiadas.

Se distinguen dos casos:

- las mezclas de celulosa/xiloglucano: las películas son estables sin adición de reticulante; por tanto sólo se sometió a prueba el efecto de la fuerza iónica y del pH sobre las capas delgadas.

- Los arabinosilanos: las películas no son estables solas (un simple lavado con agua es suficiente para hacer que desaparezca el color ya que la cohesión de las cadenas de polímeros en el interior de las capas es débil).

Se sometió a prueba la adición de resina de formaldehído/urea para estabilizar la capa de detección a base de arabinosilano con respecto al pH y a la fuerza iónica; a continuación se optimizó la cantidad de resina necesaria.

2.1.- Celulosa/xiloglucano

Durante la prueba de estabilidad se depositan cada una de las gotas de NaCl (0,1 mol/l), HCl (pH 2) y NaOH (pH 12) sobre la capa de detección, y se dejan durante tres minutos; después se aclara la capa de detección con agua.

Se observa que la superficie no cambia de color, antes y después de la prueba.

Por consiguiente la bicapa de celulosa y de xiloglucano es estable frente a los medios sometidos a prueba.

2.2.- Arabinosilano

Se estudió la influencia de varios parámetros sobre la estabilidad de las capas de arabinosilano: el tipo de arabinosilano (alta viscosidad (HV) y media viscosidad (MV)), la concentración (15 g/l y 10 g/l) y el porcentaje de resina de reticulación presente en la disolución de arabinosilano (entre el 5 y el 20%).

2.2.1.- Efecto del tipo de arabinosilano

Antes de realizar la prueba de estabilidad en condiciones agresivas, se bañaron las capas en agua.

Para ello se estudian capas de arabinosilano de media viscosidad a 15 g/l y 10 g/l con resina al 20%. Tras un baño en agua, se observa que estas capas siguen siendo homogéneas.

A continuación se estudian capas de arabinosilano de alta viscosidad a 15 g/l y 10 g/l con el 20% de resina. Tras el baño en agua, se observa un cambio de color que puede deberse a una disminución del grosor y estar asociado a una pérdida de polímero. Además, se observa que estas capas son menos homogéneas que las capas de arabinosilano de media viscosidad.

Por tanto, las capas de arabinosilano de alta viscosidad no son estables. Esto puede estar asociado al hecho de que las moléculas forman agregados, siendo el peso molecular del arabinosilano elevado. Por tanto, difícilmente puede reticularse la resina.

2.2.2.- Efecto de la concentración y del porcentaje de resina sobre la estabilidad de las capas

A raíz de los resultados anteriores, se ponen en práctica pruebas con capas de arabinosilano de media viscosidad

construidas a una velocidad de rotación de 2000 rpm y a partir de disoluciones con concentraciones de 10 y 15 g/l.

Para determinar la estabilidad de la capa, se usaron dos parámetros: la fuerza iónica y el pH (ácido y básico).

- 5 Se depositaron disoluciones de NaCl a 0,1 mol/l, de HCl a pH 2 y de NaOH a pH 12 sobre las capas delgadas de la misma manera.

Como la xilanasa está diluida en tampón de acetato, hace falta verificar si el tampón degrada la capa de polímero. Por tanto, también se somete a prueba este tampón de acetato sobre las capas de arabinoxilano.

- 10 Las pruebas de estabilidad se realizaron sobre las películas de arabinoxilano de media viscosidad a 15 g/l y 10 g/l, para diferentes concentraciones de resina (5%, 10%, 15% y 20%).

- 15 Se observa un cambio de color en el lugar de las deposiciones, en particular para concentraciones de resina del 5%, el 10%, el 15%. Este cambio de color es menos visible cuando aumenta el porcentaje de resina.

Para el resto del estudio, las capas que resultan interesantes deben ser suficientemente estables como para no aclararse con la disolución pero deben permitir visualizar una actividad enzimática.

- 20 Para responder a estos dos criterios se eligen ventajosamente las capas que contienen el 15% de resina.

Las capas de arabinoxilano de media viscosidad a 15 g/l son estables para un porcentaje de resina del 20% y las capas de arabinoxilano a 10 g/l son estables para los porcentajes de resina del 15 y el 20%.

- 25 Se observa en las dos muestras de arabinoxilano de media viscosidad a 15 g/l y 10 g/l, que hay una mancha persistente correspondiente a la disolución ácida, independientemente de la concentración de resina. Esto puede deberse al hecho de que el arabinoxilano se hidroliza en presencia de ácido. Por tanto, deben tomarse precauciones y usar la enzima en un medio poco ácido.

- 30 Se observa que el tampón de acetato no degrada la capa delgada. Por tanto, puede diluirse la enzima en tampón de acetato a pH 5, que es la condición óptima para la enzima.

2.3.- Conclusión

- 35 La capa de celulosa/xiloglucano es estable en presencia de sal, a pH ácido y a pH básico.

Las capas de arabinoxilano de alta viscosidad no son homogéneas tras el baño en agua, mientras que las películas de arabinoxilano de media viscosidad son estables.

- 40 Con las capas de arabinoxilano de media viscosidad se constata que las manchas son menos visibles cuando aumenta la concentración de resina. Por tanto, se elige continuar el estudio con las películas de arabinoxilano de media viscosidad al 15% de resina.

Ensayos similares también permitieron demostrar una estabilidad durante 24 horas.

- 45 Ejemplo 2: Medición de la actividad enzimática

Se compara la detección de la actividad enzimática mediante los dispositivos procedentes del ejemplo 1 anterior con un método clásico denominado de "Nelson".

- 50 Las enzimas estudiadas a continuación consisten en:

- β -xilanasa M1 (8000 U; 216 U/mg; 2300 U/ml; comercializada por Megazyme), y

- 55 - Cellulyve, procedente de *Trichoderma Reesei* que no se ha purificado totalmente (la actividad teórica es de 4880 nkat/g, 49 mg/g) (comercializada por Lyven).

1.- Método de Nelson

- 60 El método Nelson permite valorar los extremos reductores liberados durante la hidrólisis de un polisacárido mediante una enzima. Es una valoración indirecta: en medio alcalino y en ebullición, el grupo pseudo-aldehído de los extremos reductores reduce los iones cúpricos para dar iones cuprosos. Estos últimos reaccionan con el reactivo arsenico-molíbdeno para dar una coloración azul cuya densidad óptica (DO) varía linealmente con la cantidad de azúcares reductores. Se realiza la valoración del número de extremos al cabo de 10 minutos de incubación.

- 65 La valoración de Nelson se desarrolla en dos etapas:

- determinar una recta de calibración que determina la respuesta del método en función de la concentración en extremos reductores; esta etapa se realiza con azúcares monoméricos (glucosa y xilosa).

- 5 - valorar las actividades de las enzimas que se desea estudiar sobre polímeros en disolución: van a medirse las actividades de una xilanasa y de una celulasa sobre los arabinoxilanos y el xiloglucano, respectivamente.

1.1.- Material

10 Disolución A:

200 g de Na₂SO₄ anhidro

25 g de Na₂CO₃ anhidro

15

25 g de tartrato doble de Na-K

20 g de NaHCO₃ anhidro

20 Disolución B:

30 g de CuSO₄, 5H₂O

4 gotas de H₂SO₄ concentrado

25

H₂O csp 200 ml

Disolución C: 25 ml de la disolución A + 1 ml de la disolución B

30 Disolución D:

50 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O disuelto en 800 ml de H₂O

42 ml de H₂SO₄ concentrado, vertidos rápidamente

35

6 g Na₂HAsO₄, 7H₂O disuelto en un poco de agua

H₂O csp 1 l

40 1.2.- Preparación de los intervalos de calibración

Se prepara una disolución madre del azúcar a 250 µg/ml.

- 45 En este caso se usa una disolución madre de glucosa, como referencia para el xiloglucano. La disolución madre de xilosa será la referencia para las dos disoluciones de arabinoxilano de alta y media viscosidad.

Se realizan diferentes diluciones de la disolución madre a entre 0 y 250 µg/ml. Se mide la densidad óptica para cada concentración con el fin de obtener un intervalo de calibración.

50 1.3.- Valoración de las actividades enzimáticas:

Reacción enzimática

- 55 Para la preparación de las muestras, se introducen 135 µl de la disolución madre y 15 µl de disolución enzimática en un tubo y se incuban a 40°C durante diez minutos.

Al cabo de 10 minutos, se detiene la actividad enzimática mediante la adición de 100 µl de una muestra en 100 µl de disolución C.

- 60 La preparación del blanco permite medir la DO cuando se desactiva la enzima. El blanco está compuesto por 100 µl de la disolución C, a la que se le añaden 10 µl de enzima y 90 µl de la disolución madre.

Reacción colorimétrica

- 65 Las muestras se ponen 15 min al baño maría en ebullición.

ES 2 637 612 T3

A continuación se enfrían las muestras y se añade la disolución D (100 µl) que permite obtener colores diferentes entre el blanco y las muestras.

5 Se mantienen las placas en agitación durante diez minutos, después se añade 1 ml de agua.

Para terminar, se trasvasan 250 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, para la lectura de la densidad óptica en un lector de placas a 600 nm.

10 Para expresar los resultados, la concentración del intervalo de calibración debe expresarse en µmol.

Se usa la siguiente fórmula (1) para el cálculo de la actividad:

$$a = \text{DeltaDO} / \text{pendiente} \times 150 / 15 \times 1000 / t \times \text{dil} \quad (1)$$

15 con:

a: actividad enzimática en nkat/ml

DeltaDO: diferencia de densidad óptica entre la muestra y el blanco

20 la pendiente se expresa en µmol

150 es el volumen total de medio de reacción

25 15 es el volumen de toma de ensayo de enzima

t es el tiempo de incubación en s (para este experimento, t = 600 s)

dil es la dilución de la enzima a la que se realiza la reacción enzimática

30 la variación de DO mínima aceptable para que la medición sea válida es de 0,1.

La fórmula (2) usada para calcular la actividad mínima es la siguiente:

$$\text{Delta}(a) = \text{Delta}(\text{DeltaDO}) / \text{pendiente} \times 150 / 15 \times 1000 / t \quad (2)$$

35 Se realizó el cálculo para los intervalos de calibración de la xilosa y de la glucosa.

A partir de estos resultados, se deduce que la actividad más débil que puede medirse mediante este método es de 3 nkat/ml.

40 2.- Evaluación de la actividad enzimática sobre capa de detección

Se depositan una gota de la disolución enzimática que va a someterse a prueba y una gota del testigo (1 ml de la disolución enzimática diluida calentada a 110°C durante una hora) sobre la capa de detección durante tres minutos.

45 Se aclaran los dispositivos según la invención con el agua y se secan.

Se toman fotografías de las capas de detección en cada etapa de la prueba enzimática.

50 La primera prueba se realiza con una disolución enzimática a 125 µg/ml (0,6 nkat/ml) para Cellulyve y se realiza una dilución de la disolución de 1/2000 para la xilanasas (19 nkat/ml).

A continuación se diluyen las disoluciones enzimáticas hasta que la actividad enzimática ya no es visible en las superficies.

55 3.- Resultados

3.1.- Método de Nelson

60 *Recta de calibración*

En primer lugar se realizaron dos intervalos de calibración, que permiten determinar la relación entre la densidad

óptica medida y la concentración en extremos reductores.

El intervalo de calibración de la glucosa es la referencia para el xiloglucano; el intervalo de calibración de la xilosa es la referencia para el arabinoxilano.

5 Las rectas de calibración permitieron calcular la actividad de la enzima determinando el número de extremos reductores liberados (por tanto los cortes realizados por la enzima) en un tiempo determinado.

10 *Medición de la actividad de Cellulyve*

Se estudió la actividad de Cellulyve sobre el xiloglucano. Cellulyve procede de *Trichoderma Reesei*, un hongo que puede secretar una gran cantidad de enzimas celulósicas.

15 Se preparó una disolución madre de Cellulyve a 0,5 mg/ml cuya actividad teórica es de aproximadamente 2,4 nkat/ml.

A partir de las rectas de calibración, se determina una actividad enzimática de 7 nkat/ml. Este resultado es ligeramente diferente de la actividad teórica, pero del mismo orden de magnitud.

20 *Medición de la actividad de la xilanasa*

Se verificó la actividad de la xilanasa sobre dos sustratos: los arabinoxilanos de alta y media viscosidad.

25 Se estima que la actividad de la xilanasa pura, presentada por el proveedor, es de aproximadamente 38000 nkat/ml.

Se calculó la actividad de la xilanasa pura a partir de los resultados obtenidos para disoluciones diluidas a 1/2000 y a 1/1000.

30 En la tabla 1 a continuación se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 1

	Actividad de la xilanasa medida, nkat/ml	Actividad de la xilanasa pura, nkat/ml
AX-HV		
Dilución a 1/1000	32	31889
Dilución a 1/2000	16	31943
AX-MV		
Dilución a 1/1000	33	32828
Dilución a 1/2000	19	37080

35 Se encuentra un valor de aproximadamente 32000 nkat/ml, que es del mismo orden de magnitud que el valor proporcionado por el proveedor.

3.2.- Actividad enzimática sobre capas de detección

Celulosa/xiloglucano

40 Tal como se desarrolló anteriormente en el ejemplo 1, la capa de detección de celulosa/xiloglucano está formada mediante subcapas de una mezcla de nanocristales de celulosa de algodón (Ct) y de xiloglucano (XG), depositadas en alternancia con subcapas de clorhidrato de polialilamina (PAH).

45 La capa obtenida presenta un grosor total de 175 nm y un color amarillo pálido.

En un primer momento, se emplea la misma concentración de Cellulyve que la usada para el método de Nelson (125 µg/ml, es decir 0,6 nkat/ml).

50 Se deposita una gota de disolución enzimática (0,6 nkat/ml) y se deposita una gota de enzima inactivada (testigo: 1 ml de la disolución de enzima diluida calentada a 110°C durante una hora).

Tras la deposición de una gota de celulosa, aclarado y secado, aparece un color azul en el lugar en el que se ha depositado la enzima, haciendo suponer la disminución del grosor de la capa.

Esta disminución de grosor se confirmó mediante interferometría y mediante microscopía de fuerza atómica. La medición del perfil de interferencia (figura 5), antes y después de la acción de la enzima, muestra sin ambigüedad que el fenómeno de interferencia presente al inicio (antes de la acción de la enzima) ha desaparecido tras la acción de la enzima. Este resultado indica que el grosor de la capa de detección es inferior a 150 nm.

5 Mientras que la capa permanece inalterada tras un lavado con agua, su grosor se ve fuertemente reducido tras la acción de la enzima. Debe observarse que la rugosidad de la capa tras la acción de la enzima sigue siendo notablemente pequeña. Sin limitarse a ninguna teoría, parece que (i) o bien la enzima procede mediante erosión de la capa sin penetrar en la estructura, (ii) o bien la PAH forma una barrera frente a la acción de la enzima.

10 En este caso se observa que este dispositivo es susceptible de constituir una oportunidad para estudiar la acción de enzimas frente a sustratos sólidos. Por tanto, este dispositivo deberá permitir reconstituir un sistema modelo en medio heterogéneo.

15 A continuación, se diluye la enzima varias veces para determinar el umbral de detección de la actividad enzimática. En la tabla 2 a continuación se presentan las disoluciones estudiadas.

Tabla 2

Nombre de disoluciones	Dilución	Actividad enzimática
S1	1/40	0,06 nkat/ml
S2	1/400	$6 \cdot 10^{-3}$ nkat/ml
S3	1/4000	$6 \cdot 10^{-4}$ nkat/ml
S4	1/40000	$6 \cdot 10^{-5}$ nkat/ml

20 En la práctica, se observa que cuanto más se diluye (de S1 a S4), menos significativo es el cambio de color con respecto al color de origen. Por tanto, cuando más se diluye, menos se degrada la película de polímero.

La actividad mínima que puede detectarse visualmente, al cabo de 3 min, es de 0,06 nkat/ml (S1).

25 Ahora bien, el método de Nelson permite detectar una actividad mínima de 3 nkat/ml. Por tanto, las pruebas con el dispositivo según la invención son 20 veces más sensibles que el método de Nelson.

Por otro lado, el método de Nelson necesita un tiempo de incubación de 10 minutos mientras que la prueba según la invención tarda 3 minutos. Esto también demuestra que el método según la invención es más rápido.

30 *Arabinosilano (HV-MV)*

Una vez más, se emplea la misma concentración de enzima que la del método de Nelson (xilanasas diluida a 1/2000, es decir 19 nkat/ml)

35 Se deposita una gota de la disolución enzimática (19 nkat/ml) y una enzima inactivada (testigo) sobre las películas de arabinosilano a 15 g/l (color azul) y 10 g/l (color marrón grisáceo).

40 Entonces puede observarse, tras incubación y aclarado, que el color desaparece en el lugar en el que se ha depositado la enzima; mientras que el color permanece inalterado en el sitio de testigo.

Por tanto, como para las capas a base de celulosa y de xiloglucano, se detecta eficazmente una actividad enzimática.

45 Para el arabinosilano a 10 g/l, la actividad enzimática es menos visible ya que el color inicial de la capa de detección (marrón grisáceo) es bastante próximo al de la oblea de silicio. Por tanto, hay poco, o incluso nada, de cambio a nivel de la tonalidad cromática.

50 A continuación, se realizan otras pruebas con una dilución de la enzima para determinar el umbral mínimo de detección. En la tabla 3 a continuación se presentan las disoluciones estudiadas.

Tabla 3

Nombre de disoluciones	Dilución	Actividad enzimática
S1	1/20000	1,9 nkat/ml
S2	1/200000	0,19 nkat/ml

S3	$1/2 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^{-2}$ nkat/ml
S4	$1/2 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^{-3}$ nkat/ml

En primer lugar se estudian las diferentes diluciones de la xilanasa que han actuado sobre las películas de arabinoxilano de media viscosidad a 15 g/l y 10 g/l.

5 En la película de arabinoxilano de media viscosidad a 15 g/l, el color desaparece para una disolución enzimática con una actividad de 1,9 nkat/ml (S1). También se distingue un cambio de color para una actividad enzimática de hasta $1,9 \cdot 10^{-2}$ nkat/ml (S3).

Por tanto, la prueba con las superficies de arabinoxilano es 150 veces más sensible que el método de Nelson.

10 El grosor de las películas de arabinoxilano de media viscosidad a 10 g/l es inferior al de las películas de arabinoxilano a 15 g/l; y las enzimas degradan más fácilmente las películas de arabinoxilano a 10 g/l.

15 Para las películas de arabinoxilano de media viscosidad a 10 g/l, el cambio de color es menos visible que con las películas de arabinoxilano a 15 g/l. Esto también se debe al hecho de que el grosor de las películas de arabinoxilano a 10 g/l es menor y presenta un color que es más próximo al de la oblea de silicio.

4.- Conclusión

20 Las actividades de las enzimas determinadas mediante el método de Nelson corresponden a las actividades facilitadas por los proveedores.

Para la prueba con los dispositivos según la invención, se usaron las mismas concentraciones de enzimas que las usadas para el método de Nelson. Pudo observarse efectivamente una actividad enzimática.

25 Se realizaron diluciones para determinar el umbral de detección de una actividad enzimática por medio del dispositivo según la invención.

30 Los resultados obtenidos muestran que el dispositivo según la invención permite detectar actividades enzimáticas de 20 a 150 veces más pequeñas que las medidas mediante el método de Nelson, y esto en un tiempo tres veces más corto.

Ejemplo 3: Detección de actividad enzimática

35 MATERIAL

Se pusieron en práctica ensayos complementarios de detección de actividad enzimática con dispositivos que comprendían una capa de detección depositada según un protocolo detallado en el ejemplo 1.

40 Un primer dispositivo usado, denominado a continuación (PAH-C5/XG1)₄, comprende una capa de detección de color azul, constituida por 4 pares de subcapas, estando cada par de subcapas constituido:

- por una subcapa de PAH depositada a una concentración de 0,5 g/l, y

45 - por una subcapa constituida por una mezcla de nanocristales de celulosa y de xiloglucano, depositada respectivamente a una concentración de 5 g/l y de 1 g/l.

La presente capa de detección tiene un grosor inicial estimado de 160 nm.

50 Un segundo dispositivo usado, denominado a continuación (C5-XG1)₈, también comprende una capa de detección de color azul, constituida por 8 pares de subcapas, estando cada par de subcapas constituido:

- por una subcapa de nanocristales de celulosa, depositada a una concentración de 5 g/l, y

55 - por una subcapa de xiloglucano, depositada a una concentración de 1 g/l.

La presente capa de detección tiene un grosor inicial estimado de 90 nm.

60 La enzima estudiada consiste en una mezcla de enzimas Cellulyve TR de la sociedad Lyven, compuesta por una mezcla de varias celulasas, cuya actividad inicial es de 4880 nkat/g.

Se sometió a prueba esta disolución de enzimas a diferentes concentraciones con estos dos dispositivos, respectivamente a 0,6 nkat/ml, 0,24 nkat/ml, 0,12 nkat/ml, 0,06 nkat/ml, 0,024 nkat/ml y 0,006 nkat/ml.

RESULTADO

- 5 Se depositan las gotas de las disoluciones enzimáticas a las diferentes concentraciones sobre las capas de detección, que se colocan en la estufa a 50°C durante 3, 5, 10 y 15 min.
- Se compara el aspecto de las películas (C5-XG1)₈ y (PAH-C5/XG1)₄ antes y después de la prueba de sensibilidad enzimática. Se detecta una actividad cuando se modifica el color de la capa de detección.
- 10 Para las muestras de (C5-XG1)₈, puede observarse a los diferentes tiempos:
- a los 3 min, las actividades detectadas son aquellas a 0,6, 0,24 y 0,12 nkat/ml; la superficie de la oblea de silicio es visible para 0,6 nkat/ml.
 - 15 - a los 5 min, puede apreciarse la actividad a 0,06 nkat/ml, y la superficie del sustrato se ve afectada para las actividades a 0,6 y 0,24 nkat/ml.
 - a los 10 min, la actividad a 0,06 nkat/ml es claramente visible, y la superficie se ve afectada para las tres primeras concentraciones.
 - 20 - a los 15 min, se detecta la actividad enzimática para todas las concentraciones, haciendo que la superficie del oblea sea visible para las 4 primeras concentraciones; la actividad a 0,024 nkat/ml forma una mancha azul.
- Para las muestras de (PAH-C5/XG1)₄, puede observarse a los diferentes tiempos de incubación:
- 25 - a los 3 min, las actividades detectadas son aquellas a 0,6 y 0,24 nkat/ml.
- a los 5 min, también se detecta la actividad a 0,12 nkat/ml.
- 30 - a los 10 min, también se aprecia la actividad a 0,024 nkat/ml.
- a los 15 min, el ataque a una concentración de 0,024 nkat/ml sigue siendo visible.
- Las pruebas visuales muestran claramente que la acción de las enzimas depende del tiempo.
- 35 En efecto, para las muestras (C5-XG1)₈, con grandes actividades enzimáticas o con actividades más débiles pero para tiempos de incubación más prolongados, la superficie de la oblea de silicio es visible.
- 40 Además, aparecen manchas de colores intermedios (azul claro o azul oscuro) cuando los tiempos y/o las concentraciones no permiten un ataque hasta la oblea de silicio.
- Para las muestras (PAH-C5/XG1)₄, a todas las concentraciones y tiempos, la coloración obtenida tras el ataque enzimático es azul, más o menos intenso.
- 45 Por tanto, el ataque se realiza a lo largo de todo el grosor de las películas (C5-XG1)₈, haciendo que aparezca la superficie de las obleas de silicio a partir de los 3 min. No obstante, para las muestras (PAH-C5/XG1)₄, los ataques parecen detenerse a un mismo nivel de profundidad, correspondiendo el color azul oscuro a un grosor de 120 nm, lo que equivale a 3,5 bicapas de PAH-C5/XG1, es decir, el grosor tras la deposición de PAH.
- 50 Según estos resultados y sin limitarse a ninguna teoría, parece posible que el ataque de las enzimas sobre las películas (PAH-C5/XG1)₄ se detenga por la capa de PAH. El PAH desempeñará por tanto un papel de barrera frente a las enzimas, que sólo atacan la celulosa y el xiloglucano, y por tanto no permite alcanzar la superficie de las obleas de silicio como para las películas (C5-XG1)₈.
- 55 Cada una de estas construcciones presenta ventajas.
- La construcción PAH-C5/XG1 permite una elección de los colores deseados al final de la prueba, haciendo variar su grosor. No obstante, no permite cuantificar "la intensidad" de ataque, siendo los colores finales los mismos.
- 60 La construcción C5-XG1 permite ver de manera más evidente el ataque enzimático. En efecto, la totalidad de la capa de detección puede degradarse cuando se juntan las condiciones, y permite ver ataques no completos, debido a un cambio de colores de la capa de detección.
- En los dos casos, la detección es 50 veces más sensible que durante los ensayos según el ejemplo 2.
- 65

Ejemplo 4: Detección de actividad enzimática

MATERIAL

5 Se pusieron en práctica ensayos complementarios de detección de actividad enzimática con dispositivos que comprendían una capa de detección depositada según un protocolo detallado en el ejemplo 1.

Dos dispositivos usados, denominados a continuación (C5-XG1)₅ y (C5-XG1)₈, comprenden una capa de detección constituida, respectivamente, por 5 y por 8 pares de subcapas.

10 Cada par de subcapas está constituido:

- por una subcapa de nanocristales de celulosa, depositada a una concentración de 5 g/l, y

15 - por una subcapa de xiloglucano, depositada a una concentración de 1 g/l.

Las películas presentan respectivamente:

- para la película (C5-XG1)₅, un color marrón y un grosor del orden de 70 nm, y

20 - para la película (C5-XG1)₈, un color azul y un grosor del orden de 127,5 nm con una variación estándar de 3,28 nm.

La enzima estudiada consiste en una mezcla de enzimas Cellulyve TR de la sociedad Lyven, compuesta por una mezcla de varias celulasas, cuya actividad inicial es de 4880 nkat/g.

25 Se somete a prueba esta disolución de enzimas con estos dos dispositivos respectivamente a las siguientes concentraciones: 100 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 20 mg/l, 15 mg/l, 10 mg/l, 1 mg/l y 0,1 mg/l.

RESULTADO

30 Se depositan gotas de 2 µl de las disoluciones enzimáticas, a las diferentes concentraciones, sobre las capas de detección que a continuación se ponen en la estufa a 50°C durante 10 min, 30 min y 60 min.

Se compara el aspecto de las películas (C5-XG1)₅ y (C5-XG1)₈ antes y después de la prueba de sensibilidad enzimática. Se detecta una actividad cuando se modifica el color de la capa de detección.

35 Para la muestra (C5-XG1)₈, después de 10 min de reacción, el sustrato es visible para las concentraciones de 100 mg/l y de 50 mg/l, lo que sugiere una degradación total de la película.

40 Además, el color de la película cambia hacia el castaño para algunas de las siguientes concentraciones inferiores, a saber de 25 mg/l, 20 mg/l y 15 mg/l, mientras que permanece inalterado a partir de una concentración de 10 mg/l.

Después de 30 min de reacción, la degradación de la muestra (C5-XG1)₈ mediante las disoluciones de enzimas a las concentraciones de 15 y 10 mg/l es claramente visible.

45 El aumento del tiempo de reacción a 60 min no mejora significativamente la detección, en el sentido de que las concentraciones más bajas (1 mg/l y 0,1 mg/l) siguen sin provocar ningún cambio de color.

50 En cambio, resulta interesante observar que la degradación mediante la disolución de enzimas a la concentración de 10 mg/l aumenta a 60 min de incubación, en comparación con un tiempo de incubación de 30 min, ya que el color marrón visible a 30 min se sustituye por el color gris del sustrato a 60 min.

Los ensayos con la muestra (C5-XG1)₅ muestran características similares.

55 La única diferencia se encuentra en la disolución de enzimas a la concentración de 10 mg/l: la degradación es completa para la muestra (C5-XG1)₅ después de 30 min, mientras que esta degradación era parcial para la muestra (C5-XG1)₈ tal como se precisó anteriormente.

60 Estos resultados muestran que el tiempo de reacción y el grosor de la película constituyen parámetros importantes para optimizar la sensibilidad y la respuesta durante el ensayo.

65 Además, la combinación del tiempo de reacción y del grosor de la capa de detección constituye parámetros ajustables para una evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática. Por ejemplo, la disolución de enzimas cuya concentración es de 10 mg/l no se detecta después de 10 min de incubación, pero presenta un resultado positivo después de 30 min de incubación (como recordatorio, se obtiene una degradación parcial para la muestra (C5-XG1)₈).

Ejemplo 5: Formulación y degradación para biopolímeros complementarios

5 Con el fin de evaluar las posibilidades de aplicación del método según la invención a otros biopolímeros, se realizó una breve evaluación de varios pares de biopolímeros/enzimas usando la desaparición del color como validación de la detección de la actividad.

Según los ejemplos 1 a 3, se realizaron deposiciones sobre sustratos de silicio que presentaban un índice de refracción más elevado que el de la capa de biopolímeros, permitiendo intensificar los colores.

10 En cada caso, se usó agua y la disolución de enzima desactivada térmicamente (se somete la disolución a ebullición durante algunos minutos y después se deposita) como referencias.

15 Para todos los resultados presentados a continuación, se incuban las disoluciones de enzima, las disoluciones de enzima desactivada y de agua, durante 3 min a temperatura ambiente.

DEPOSICIÓN DE ALBÚMINA BOVINA SÉRICA, DEGRADACIÓN MEDIANTE TRIPSINA.

20 Se obtuvo la capa de albúmina bovina sérica mediante recubrimiento por centrifugación de una disolución a 10 g/l que contenía 0,1 g/l de una resina MUF. Se reticuló la capa a 90°C durante una hora.

DEPOSICIÓN DE ALBÚMINA BOVINA SÉRICA EN MEZCLA CON QUITOSANO, DEGRADACIÓN MEDIANTE TRIPSINA.

25 Se obtuvo la capa de albúmina bovina sérica mediante recubrimiento por centrifugación de una disolución a 10 g/l de SAB mezclada con quitosano (10 g/l) para favorecer la reticulación. Se inmovilizó la capa añadiendo la disolución a 0,1 g/l de una resina MUF seguida por una reticulación a 90°C durante una hora.

DEPOSICIÓN DE PECTINA Y DEGRADACIÓN MEDIANTE UN CÓCTEL PECTINOLÍTICO.

30 Se obtuvo la capa de pectina mediante recubrimiento por centrifugación de una disolución a 10 g/l que contenía el 5% en peso de resina MUF. Se reticuló la capa a 90°C durante una hora.

RESULTADOS

35 En los tres casos, tras la incubación y el aclarado, se observa un cambio de color únicamente a nivel del sitio de deposición de la disolución de enzima activa.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo colorimétrico para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés,
- 5 estando caracterizado el dispositivo (1) porque comprende (i) un sustrato (2) delimitado al menos por una superficie (2a) superior, y (ii) una capa (3) transparente de detección, que tiene un primer grosor e y que comprende dicho polímero de interés,
- 10 comprendiendo la capa (3) transparente de detección, por un lado, una superficie (3a) superior, sobre la que está destinada a aplicarse dicha disolución acuosa de interés y que forma una primera superficie (4) de contacto entre el aire y la capa (3) de detección y, por otro lado, una superficie (3b) inferior, formada sobre dicha superficie (2a) superior del sustrato (2) y que forman en conjunto una segunda superficie (5) de contacto entre la capa (3) de detección y el sustrato (2),
- 15 estando libre la superficie (3a) superior de la capa (3) transparente de detección, no estando recubierta de ningún modo por una capa adicional,
- 20 siendo adecuadas la primera superficie (4) de contacto y la segunda superficie (5) de contacto para generar un fenómeno óptico de reflexión,
- estando adaptada la capa (3) de detección para, por un lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando carece de dicha actividad enzimática hidrolítica, conservar dicho primer grosor e y, por otro lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, presentar un segundo grosor e' , inferior a dicho primer grosor e ,
- 25 y porque dicho primer grosor e y/o dicho segundo grosor e' de dicha capa (3) transparente de detección están adaptados para producir un color mediante un fenómeno óptico de interferencia generado mediante la recombinación de los haces luminosos reflejados en dicha primera superficie (4) de contacto y en dicha segunda superficie (5) de contacto.
- 30
2. Dispositivo colorimétrico según la reivindicación 1, caracterizado porque el primer grosor e de la capa (3) de detección se elige para producir un primer color mediante un fenómeno óptico de interferencia, y porque dicha capa (3) de detección está adaptada para, por un lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando carece de dicha actividad enzimática hidrolítica, conservar dicho primer grosor e que produce dicho primer color, y por otro lado, tras la aplicación de dicha disolución acuosa de interés cuando comprende dicha actividad enzimática hidrolítica, presentar un segundo grosor e' , inferior a dicho primer grosor e , que produce o bien un segundo color mediante un fenómeno óptico de interferencia, diferente de dicho primer color, o bien la desaparición de dicho primer color.
- 35
- 40
3. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el primer grosor e de la capa (3) transparente de detección es un grosor uniforme, elegido de un intervalo de grosor comprendido entre 70 y 900 nm.
- 45
4. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el primer grosor e y/o el segundo grosor e' de dicha capa (3) transparente de detección están adaptados para producir un color mediante un fenómeno óptico de interferencia, con una reflectancia máxima para una longitud de onda comprendida entre 380 nm y 780 nm.
- 50
5. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la capa (3) transparente de detección tiene un índice de refracción n_c comprendido entre 1,2 y 1,7, y preferiblemente comprendido entre 1,4 y 1,6.
- 55
6. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el polímero contenido en la capa (3) transparente de detección se elige de los biopolímeros.
7. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el sustrato (2) es transparente, y porque la capa (3) transparente de detección tiene un índice de refracción n_c que es diferente del índice de refracción n_s de dicho sustrato (2).
- 60
8. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el sustrato (2) es opaco y comprende una superficie (2a) superior reflectante.
9. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el o los polímeros contenidos en la capa (3) transparente de detección están en una forma inmovilizada.
- 65

10. Dispositivo colorimétrico según la reivindicación 9, caracterizado porque la capa (3) transparente de detección contiene nanocristales que forman redes de enlaces de hidrógeno con el polímero de interés.
- 5 11. Dispositivo colorimétrico según la reivindicación 10, caracterizado porque los nanocristales consisten en nanocristales de polisacáridos, y preferiblemente en nanocristales de celulosa.
- 10 12. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque los nanocristales tienen una carga de superficie negativa, porque la capa (3) transparente de detección está constituida por al menos dos subcapas (6) que contienen cada una el polímero de interés, y porque dichas subcapas (6) de polímero están separadas de dos en dos por una subcapa (7) intercalada que contiene un compuesto policatiónico.
- 15 13. Dispositivo colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, caracterizado porque la capa (3) transparente de detección está constituida por al menos un par de dos subcapas (6, 7) que contienen cada una al menos un polímero de interés, comprendiendo una primera subcapa (6) un primer o varios primeros polímeros de interés, y conteniendo una segunda subcapa (7) un segundo o varios segundos polímeros de interés.
- 20 14. Dispositivo colorimétrico según la reivindicación 9, caracterizado porque la capa (3) transparente de detección contiene una resina que forma redes de enlaces covalentes con el polímero de interés.
- 25 15. Procedimiento para la detección, en una disolución acuosa de interés, de una actividad enzimática hidrolítica con respecto a al menos un polímero de interés, caracterizado porque comprende al menos la sucesión de las siguientes etapas:
- 30 - proporcionar un dispositivo (1) colorimétrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14,
- aplicar dicha disolución acuosa de interés sobre la superficie (3a) superior de la capa (3) transparente de detección,
- lavar dicha superficie (3a) superior de la capa (3) transparente de detección,
- secar dicha capa (3) transparente de detección, y
- analizar el color de dicha capa (3) transparente de detección a nivel del sitio de aplicación de dicha disolución de interés.

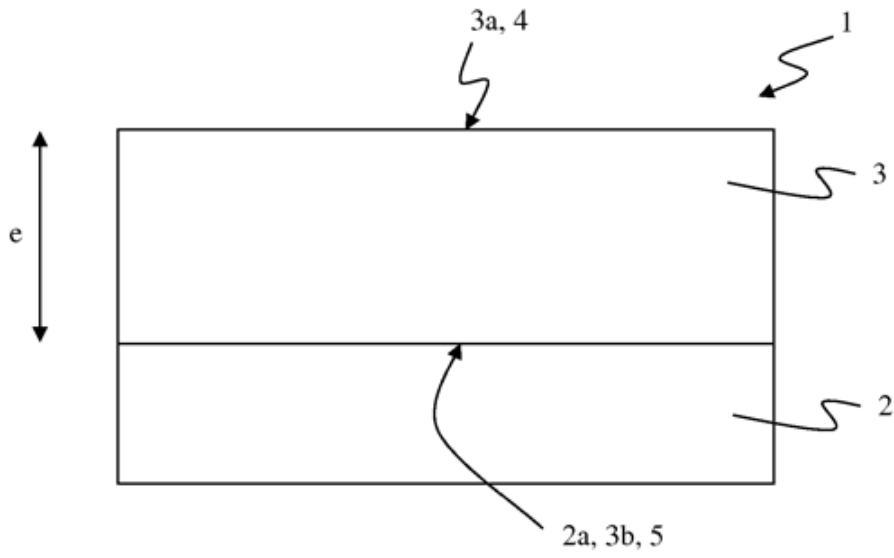


Figura 1

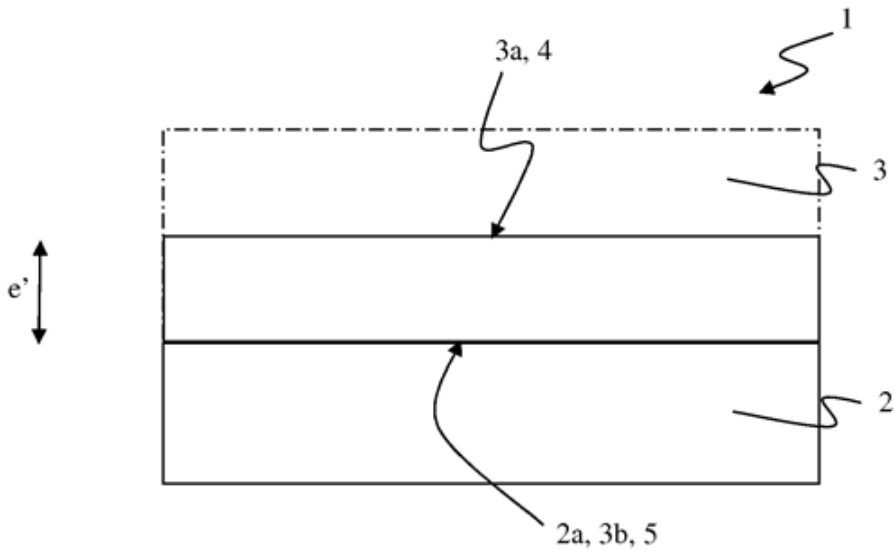


Figura 2

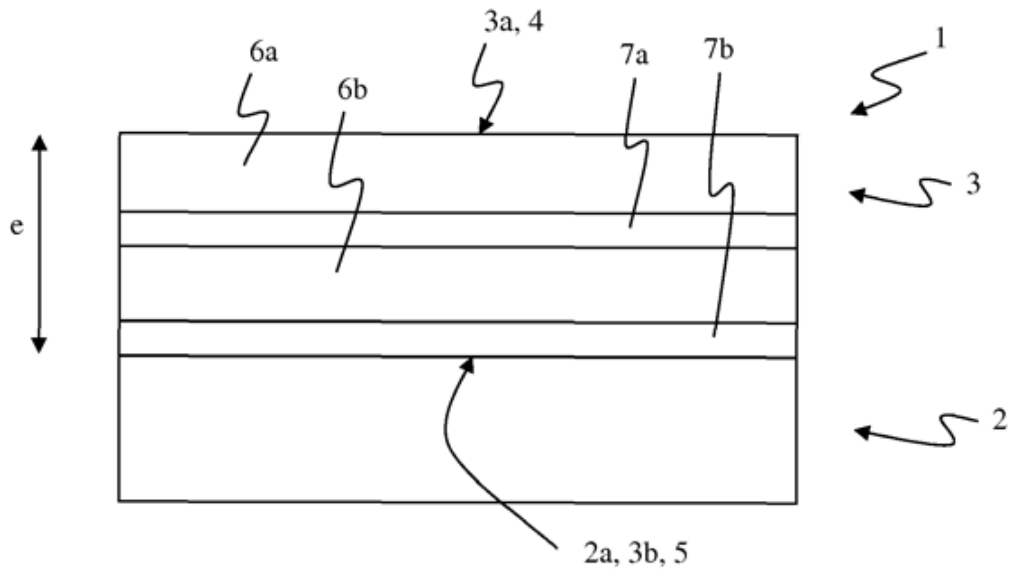


Figura 3

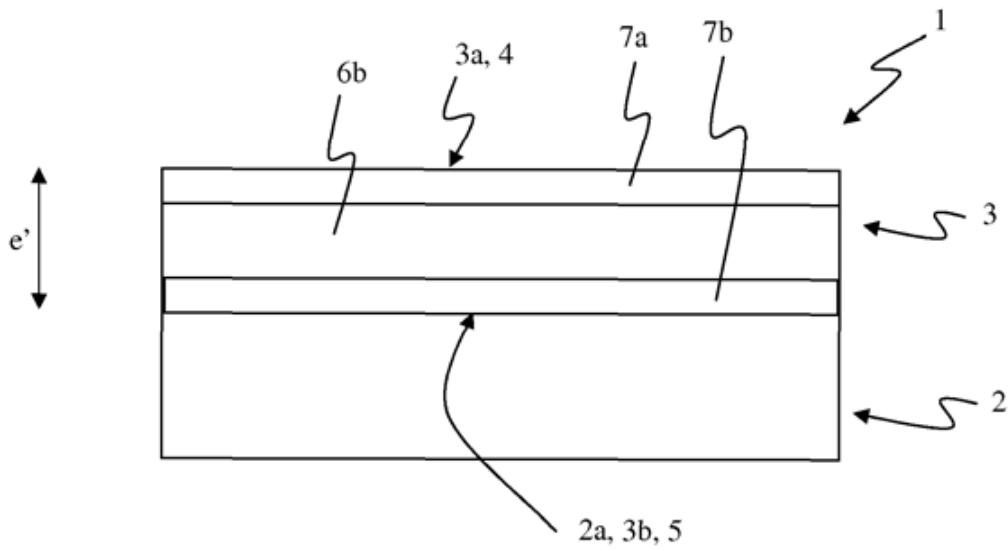


Figura 4

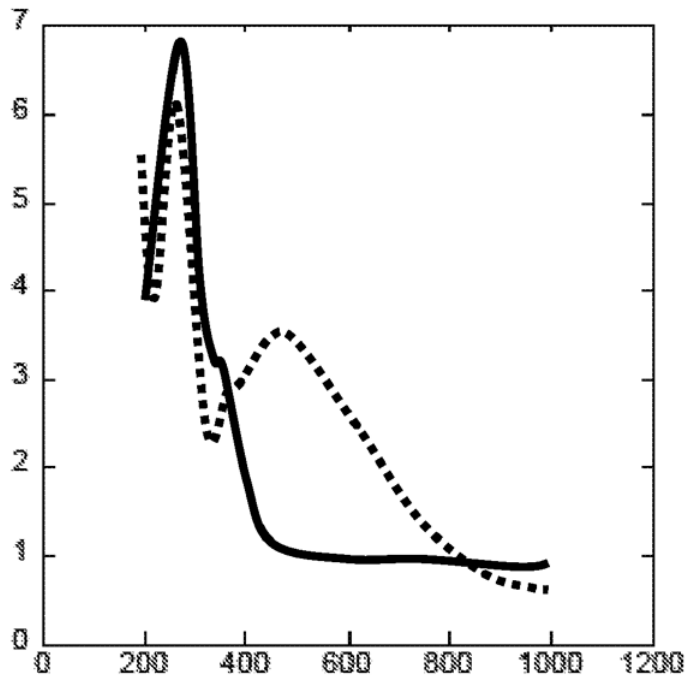


Figura 5