

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 151**

21 Número de solicitud: 201431875

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/25** (2006.01)

**G01N 27/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**18.12.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**17.04.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)**

**Carretera San Vicente del Raspeig, s/n**

**03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ IBÁÑEZ, Naiara;**

**INIESTA VALCÁRCEL, Jesús;**

**MONTIEL LEGUEY, Vicente y**

**BANKS, Craig Edward**

54 Título: **Procedimiento de preparación de biosensor amperométrico de lactato, biosensor obtenido mediante ese procedimiento y su uso en medios complejos**

57 Resumen:

Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico para la determinación de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) que comprende las siguientes etapas: dispersión de un biopolímero en disolvente orgánico; preparación de disolución mediadora añadiendo un mediador y nanotubos de carbono; preparación de disolución enzimática con al menos la enzima LOD; adición de la disolución mediadora y enzimática sobre una plataforma serigrafiada desechable; y secado del biosensor. También son objeto de la presente invención, el biosensor obtenido mediante este procedimiento, donde el biopolímero está basado en polisacáridos de glucosa y amilosa con grupos funcionales hidroxilo, amino, acetilo o carboxílicos y presenta enlaces glicosídicos; y su uso en medios complejos como medios celulares embrionarios, medios alimentarios o muestras de sangre.

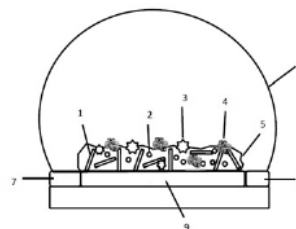


Fig. 1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de biosensor amperométrico de lactato, biosensor obtenido mediante ese procedimiento y su uso en medios complejos.

5

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en el campo de los sensores amperométricos de uso en reproducción asistida, cuya finalidad más concretamente se centra en la detección y determinación de lactato/ácido láctico en medios complejos como los medios de cultivos celulares, empleados en el desarrollo y crecimiento de células de embriones humanos.

10

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15

La mayoría de las investigaciones para el desarrollo de biosensores electroquímicos de lactato se centran en mejorar:

20

- (i) la inmovilización de la enzima empleada sobre el material del electrodo,
- (ii) la mejora de la transferencia electrónica,
- (iii) el tipo de mediadores y coenzimas,
- (iv) la mejora de la estabilidad del sensor, y
- (v) la miniaturización del biosensor.

25

Teniendo en cuenta estas premisas, durante las últimas tres décadas han ido creciendo las investigaciones sobre el desarrollo de biosensores de lactato debido a su importancia en distintas áreas de aplicación. En la mayoría de estudios que se pueden encontrar en la actualidad, se opta por la fabricación de biosensores amperométricos basados en dos tipos de enzimas: la lactato oxidasa y la lactato deshidrogenasa. Esta última requiere de la presencia del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) que es reducido a  $\text{NADH}$ , lo que conlleva la fabricación de un biosensor sofisticado, caro y con un tiempo de vida limitado [L. Agúí, M. Eguílaz, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 21 (2009) 386; A.C. Pereira, M.R. Aguiar, A. Kisner, D.V. Macedo, L.T. Kubota, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 124 (2007) 269]. Por el contrario la enzima lactato oxidasa contiene el cofactor Flavín adenín dinucleótido ( $\text{FAD}$ ) en su estructura, que cataliza la conversión de lactato a piruvato en presencia de  $\text{O}_2$  generándose al mismo tiempo  $\text{H}_2\text{O}_2$  como producto [V.P. Zanini, B. López De Mishima, V. Solís, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 155 (2011) 75]. Por tanto y, debido fundamentalmente a que el cofactor  $\text{NADH}$  se encuentra presente en medios de cultivo embrionario, lo que interferiría en la medida si se utilizara un biosensor basado en la lactato deshidrogenasa, es necesario desarrollar biosensores electroquímicos de lactato en los cuales sea empleada como enzima la lactato oxidasa.

30

35

40

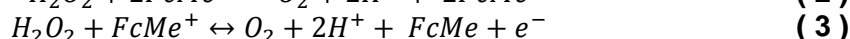
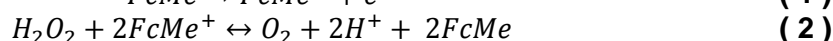
45

50

Los biosensores amperométricos de lactato, que emplean lactato oxidasa como biocatalizador para la reacción de oxidación de lactato a piruvato generando peróxido de hidrógeno, funcionan cuando se les somete a un potencial entre +0.5 y +0.65 V frente al electrodo de referencia  $\text{AgCl/Ag}$  (cloruro 3 M). Este es el rango de potenciales necesario para oxidar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la superficie del electrodo y, por consiguiente, establecer una respuesta cuantificable que relaciona la intensidad de corriente obtenida con la cantidad de lactato presente en disolución de estudio [L. Rassaei, W. Olthuis, S. Tsujimura, E.J.R. Sudhölter, A. Van Den Berg, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2013) 123]. El problema de estos biosensores amperométricos de lactato es el elevado potencial al cual se debe realizar la medida cuando el medio en el que se encuentra el lactato puede contener a

5 otras sustancias que también pueden contribuir a la lectura de la corriente registrable a estos potenciales (son los denominados interferentes). Para evitar esta circunstancia, debemos encontrar un rango de potenciales dónde dichas sustancias no contribuyan a la lectura de corriente que sólo debe ser debida a la presencia del lactato. Por tanto, es necesario el desarrollo de biosensores amperométricos de lactato que puedan operar a potenciales de trabajo del electrodo bajos y, consecuentemente, se puedan evitar interferencias debidas a esas especies electroactivas que pueden oxidarse a potenciales más elevados.

10 La estrategia elegida hasta el momento en la bibliografía relacionada es la búsqueda de mediadores que favorezcan la disminución del potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la especie enzima lactato oxidasa. De esta forma el proceso de oxidación no se lleva a cabo directamente sobre la superficie del sensor sino a través de un mediador anclado a ésta y ello se produce a un potencial sensiblemente inferior al descrito habitualmente [Costa Eric D, Electrochemical biosensor stability. Patent Number: EP546019-A; WO9204466-A1; AU9184377-A]. En la literatura se pueden encontrar mediadores redox de distinta naturaleza, entre los más utilizados se encuentran la ftalocianina de cobalto [F.J. Rawson, W.M. Purcell, J. Xu, R.M. Pemberton, P.R. Fielden, N. Biddle, J.P. Hart, Talanta 77 (2009) 1149], el ferroceno [S. Pérez, E. Fàbregas, Analyst 137 (2012) 3854] o derivados de éste como el ferroceno metanol (FcMe) [V.P. Zanini, B. López De Mishima, V. Solís, Sensors and Actuators, B: Chemical 155 (2011) 75, X. Li, J. Zang, Y. Liu, Z. Lu, Q. Li, C.M. Li, Analytica Chimica Acta 771 (2013) 102]. A potenciales de +0.19 V el ferroceno metanol se oxida a ferrocinio (1), el ferrocinio oxida posteriormente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) formado tras la oxidación del lactato por la enzima lactato oxidasa (en adelante LOD), finalmente detectándose la posterior señal electroquímica a un potencial formal de +0.19 V frente a un electrodo de referencia AgCl/Ag (3 M KCl) (3). Como se puede observar, el potencial se reduce notablemente de +0.65 V a +0.19 V, pudiéndose evitar la interferencia de otras sustancias electroactivas presentes en el medio de estudio.



30 El grupo de Fàbregas y Pérez [S. Pérez, E. Fàbregas, Analyst 137 (2012) 3854] inmovilizan simultáneamente la enzima lactato oxidasa junto con la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP). En este sistema bienzimático la oxidación de lactato está catalizada por la enzima lactato oxidasa dando como subproducto peróxido de hidrógeno que posteriormente se reduce a H<sub>2</sub>O por la acción catalítica de la enzima HRP en su forma reducida, dando lugar a la enzima HRP en su forma oxidada. Finalmente, la enzima HRP en su forma oxidada se reduce por el FcMe dando lugar a la especie ferrocinio metanol (FcMe<sup>+</sup>), que posteriormente se reduce electroquímicamente a un potencial de -200 mV frente a un electrodo pseudoreferencia de pasta de plata / cloruro de plata.

40 Por otra parte y para que estos sistemas puedan funcionar correctamente, es necesario inmovilizar la enzima LOD sobre la superficie del biosensor. Entre los distintos procedimientos referenciados algunos autores apuestan por el empleo de matrices de sol-gel [J. Huang, J. Li, Y. Yang, X. Wang, B. Wu, J.i. Anzai, T. Osa, Q. Chen, Materials Science and Engineering C 28 (2008) 1070; J. Weber, A. Kumar, S. Bhansali, Sensors and Actuators, B: Chemical 117 (2006) 308] por ser inertes químicamente, por la posibilidad de modificar la porosidad y por permitir trabajar a bajas temperaturas. Un ejemplo de lo anterior es el biosensor fabricado por Huang y colaboradores, quienes emplearon una matriz de sílice sol-gel mediante la mezcla de Tetraetil ortosilicato (TEOS), H<sub>2</sub>O y HCl que adicionaron sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbón de pared múltiple (MWCNT)

y nanopartículas de platino, obteniendo un biosensor para la medida de muestras de sangre con una sensibilidad de  $6.36 \mu\text{A}/\text{mM}$ , un rango de linealidad de  $(0.2\text{--}2) \times 10^{-3} \text{ M}$ , pero con una estabilidad de 4 semanas [J. Huang, J. Li, Y. Yang, X. Wang, B. Wu, J.i. Anzai, T. Osa, Q. Chen, *Materials Science and Engineering C* 28 (2008) 1070].

5

Otros autores han preferido como sustrato la combinación de una matriz de sílice y un biopolímero, de modo que la matriz de sílice aportaba el carácter hidrofílico, el biopolímero mejoraba la inmovilización de la proteína y, con ello, el biosensor amperométrico mejoraba la transferencia iónica, proporcionando estabilidad mecánica y buena adhesión. Un ejemplo sobre la estrategia anterior corresponde al biosensor realizado por Zanini y col., quienes emplearon un hidrogel de laponita en presencia de quitosano sobre un sustrato masivo de carbón vítreo para la medida de lactato en alimentos presentando una sensibilidad de  $0.326 \pm 0.003 \text{ A cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$  y un límite de detección de  $(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ M}$  [V.P. Zanini, B. López De Mishima, V. Solís, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 155 (2011) 75; X. Li, J. Zang, Y. Liu, Z. Lu, Q. Li, C.M. Li, *Analytica Chimica Acta* 771 (2013) 102]. Sin embargo el biosensor fue probado únicamente para la determinación de lactato en bebidas alcohólicas y productos lácteos. No obstante, el empleo de un electrodo de carbón vítreo, conlleva el requerimiento de un montaje para la determinación más complejo de lo deseable.

10

15

20

Un aspecto fundamental para la aplicabilidad de un sensor es su sensibilidad para la respuesta analítica buscada. Una forma de aumentar la sensibilidad de un biosensor consiste en el aumento de la carga de enzima. Esto se lleva a cabo normalmente aumentando el área superficial del electrodo. El área del electrodo se puede aumentar empleando nanomateriales como nanotubos de carbono, grafeno o nanopartículas metálicas. Algunos autores prefieren la combinación de nanomateriales con polímeros conductores. La combinación de ambos confiere al biosensor propiedades especiales debido al efecto sinérgico de los componentes individuales, como por ejemplo, la combinación de MWCNTs y polisulfona para la fabricación de un biosensor con la finalidad de determinar lactato en muestras de vino y cerveza [S. Pérez, E. Fàbregas, *Analyst* 137 (2012) 3854] utilizando una plataforma serigrafiada de grafito. Los resultados mostraron unos límites de detección de  $0.05 \text{ mg/L}$ , un rango de linealidad entre  $0.1\text{--}0.5 \text{ mg/L}$ , pero con una estabilidad del 40 % tras 2 semanas, almacenándose el electrodo en una disolución tampón fosfato a pH neutro.

25

30

35

Con la finalidad de conseguir una mayor biocompatibilidad junto con una buena sensibilidad del biosensor amperométrico de lactato, varios autores han empleado materiales híbridos formados por biopolímeros y nanotubos de carbono. Este es el caso del empleo del biopolímero quitosano junto con nanotubos de carbono, aplicado a la fabricación del biosensor amperométrico de lactato realizado por el grupo de Monosík [Monošik, R.; Stred'anský, M.; Greif, G.; Šturdík, E., *Food Control* 23, (2012) 238.], cuya preparación se lleva a cabo preparando una mezcla de MWCNT y n-icosano la cual se deposita sobre un electrodo de oro de  $1.6 \text{ mm}$  de diámetro que incluía un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Una vez seco, la proteína se inmovilizaba intercalando láminas de quitosano (1 % w/w, disolución acuosa en ácido acético). La disolución enzimática consistió en una disolución acuosa de LOD y HRP. El depósito de cada capa se realizaba justo después del secado la capa anterior. Las medidas se llevaron a cabo a un potencial de  $-50 \text{ mV}$ . Este biosensor presentaba un rango de linealidad de  $5\text{--}244 \mu\text{M}$ , un coeficiente de correlación de 0.994 y una estabilidad de almacenamiento a largo plazo del 90 % tras 15 meses. La aplicación del biosensor se centró en el análisis de lactato en muestras de alimentos sólidos y vino. Sin embargo, la preparación del biosensor resulta todavía demasiado compleja para la potencial comercialización del biosensor.

40

45

50

Zhenyu Zhou y colaboradores [Zhou, Z.; Xu, L.; Wu, S.; Su, B. *Analyst* 139 (2014), 4934] también fabricaron un biosensor empleando quitosano y MWCNT para la fabricación de un biosensor electroquimioluminiscente para la determinación de glucosa, lactato y colina. Para su fabricación disolvieron quitosano en ácido acético (1% w/w) ajustando el pH a 5 con NaOH y se dejó sonicando durante 40 minutos. Por otro lado, 4 mg de MWCNTs se dispersaron en 2 mL de la disolución anterior, y a continuación 200  $\mu\text{L}$  de la dispersión resultante se mezclan con 100  $\mu\text{L}$  de LOD. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla se depositan sobre un sustrato de óxido de indio y estaño (ITO) (área 1.2 cm x 2.5 cm) y se extendieron sobre la superficie y se dejó secar. El biosensor presentó un límite de detección para lactato de 97  $\mu\text{M}$ . Desafortunadamente no mostraron datos sobre la estabilidad del biosensor amperométrico de lactato y su aplicación en muestras reales.

Por otro lado, el grupo de Cui [X. Cui, C.M. Li, J. Zang, S. Yu, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 3288] también prepararon una disolución de quitosano (1% w/w) en HCl ajustando el pH a 5 con NaOH, adicionando posteriormente: nanotubos de carbono CNTs (hasta una concentración 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); LOD (hasta una concentración 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); y un complejo de osmio-con polivinilimidazolio-Os PVI-Os (hasta una concentración 4  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Sin embargo, el sustrato metálico utilizado era oro modificado con una capa autoensamblada de ácido mercaptopropiónico MPA. Una vez seco el sustrato metálico se depositan 3  $\mu\text{L}$  de la disolución quitosano/CNTs/LOD/PVI-Os sobre la superficie del electrodo de oro modificado con MPA y se deja secar en una incubadora a 37 °C durante 3 horas. Una vez preparado se lavaba bajo agitación con una disolución tampón de fosfato a pH neutro durante 2 horas y finalmente se almacena al aire a 4 °C. El biosensor presentó un límite de detección de 5  $\mu\text{M}$ , con un buen rango de linealidad hasta 1 mM, pero de nuevo los autores no presentaron datos sobre la estabilidad del biosensor amperométrico de lactato ni sus aplicaciones en muestras reales.

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Sin embargo, hasta la fecha no existe la descripción de ningún biosensor para la detección de lactato que emplee conjuntamente la enzima LOD y MWCNTs junto con otros polisacáridos o biopolímeros distintos al quitosano.

El éxito de la introducción de los biosensores amperométricos de lactato en el mercado debe fundamentarse en su simplicidad, respuesta rápida, sensibilidad, bajo coste y portabilidad. Para conseguir algunos de estos aspectos es esencial la miniaturización de los biosensores amperométricos. En los últimos años se ha ido incrementando el uso de plataformas serigrafiadas para la fabricación de biosensores de lactato. A día de hoy no existe en el estado del arte autores que empleen la combinación de los biopolímeros, junto con los nanotubos de carbono (CNT) exclusivamente para la fabricación de biosensores amperométricos de lactato que empleen lactato oxidasa y que además necesariamente empleen plataformas serigrafiadas.

Uno de los campos donde más impacto ha supuesto el empleo de plataformas serigrafiadas corresponde al análisis clínico, como por ejemplo en el análisis de muestras sanguíneas. Un ejemplo es el biosensor amperométrico fabricado por Shimomura y col [T. Shimomura, T. Sumiya, M. Ono, T. Ito, T.A. Hanaoka, *Analytica Chimica Acta* 714 (2012) 114], que consistía en una plataforma serigrafiada carbonosa modificada con ftalocianina de cobalto (II) (CoPC), que resultaba ser un buen electrocatalizador para la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En este caso es reseñable la adición de una capa de Nafion con la finalidad de proteger al biosensor de posibles interferentes. Por otro lado, Rawson y col. [F.J. Rawson, W.M. Purcell, J. Xu, R.M. Pemberton, P.R. Fielden, N. Biddle, J.P. Hart, *Talanta* 77 (2009) 1149] emplearon plataformas serigrafiadas de una tinta de carbono que contenían CoPC como electrocatalizador, empleando el biosensor amperométrico como plataforma para monitorizar

el metabolismo celular *in vitro*. Por tanto, se encuentran descritos biosensores inmovilizados en plataformas serigrafiadas para el análisis de lactato en medios complejos, lo que implica, necesariamente, el uso de capas externas para proteger el biosensor y evitar los interferentes.

5

Cabe destacar que no existen descritos en la literatura biosensores amperométricos aplicados en la determinación de lactato en medios de cultivo embrionario, como son los utilizados en reproducción asistida, que utilicen plataformas serigrafiadas desechables para realizar las medidas en tiempo real o *in situ*. Los cambios metabólicos en medios de cultivo celular después de retirar el embrión humano –o incluso durante su desarrollo– en términos de consumo o formación de nuevos metabolitos, puede reflejar la calidad y, por lo tanto, la viabilidad del embrión para su transferencia al útero materno. El lactato es un componente vital consumido durante los primeros días del desarrollo embrionario, por lo que se considera un metabolito significativamente diferente de un desarrollo celular adecuado. Por lo tanto la monitorización de lactato en tiempo real e *in situ* permite al embriólogo tener un dato adicional para la selección y valoración del embrión humano.

10

15

Así pues, según todo lo anterior, los mayores inconvenientes de los biosensores amperométricos de lactato en la actualidad son:

20

- (I) la baja estabilidad que generalmente presentan, bien por el deterioro del electrodo empleado o por la poca estabilidad enzimática,
- (II) la necesidad de emplear un montaje tedioso para la realización de la medida,
- (III) la baja reproducibilidad de los biosensores amperométricos de lactato, y
- (IV) que no existe hasta la fecha ningún dispositivo electroquímico desechable para la determinación y cuantificación de lactato en medios complejos como los medios de cultivo embrionario.

25

### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

30

Se hace necesario a la luz de lo anteriormente expuesto, buscar un procedimiento de preparación de biosensores de lactato que permitan la detección y cuantificación de lactato en cualquier medio de cultivo, especialmente en medios complejos como los medios de cultivo embrionario, que sean estables, reproducibles, de fácil manejo, con una rápida respuesta y que sean económicos.

35

El procedimiento descrito en la presente invención permite fabricar biosensores capaces de superar los inconvenientes que presentan los biosensores amperométricos actuales, gracias a los materiales empleados y al método de preparación.

40

Un objeto de la presente invención se refiere, pues, al procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico para la determinación de lactato que comprende las siguientes etapas:

45

50

1. Dispersión de un biopolímero en disolvente orgánico.
2. A la dispersión anterior se adicionan un mediador y nanotubos de carbono, para dar lugar a la disolución mediadora.
3. Preparación de la disolución enzimática disolviendo al menos la enzima LOD en una disolución tampón a pH neutro.
4. Adición de la disolución mediadora obtenida en la etapa 2 sobre una plataforma serigrafiada.
5. Adición de la disolución enzimática obtenida en la etapa 3 sobre la plataforma serigrafiada y la disolución mediadora.

## 6. Secado del biosensor para la eliminación del disolvente.

5 En una realización preferente, el biopolímero utilizado está basado en polisacáridos de glucosa o amilosa, funcionalizados con grupos, amino, acetilo o carboxílico, que contienen enlaces glucosídicos. Estos materiales son polímeros biocompatibles del tipo quitosano, almidón, quitina, ácido hialurónico, glucógeno y celulosa, que presentan enlaces glucosídicos de glucosa, amilosa o N-acetil-D-glucosamina.

10 En otra realización preferente, el disolvente orgánico utilizado para la dispersión del biopolímero es la dimetilformamida. En otra realización preferente, el disolvente puede ser una combinación de dimetilformamida y etanol, en proporción 1:3 (v:v).

15 En una realización preferente adicional, el mediador utilizado en la etapa 2 del procedimiento es el ferroceno metanol (FcMe).

Preferentemente, los nanotubos utilizados en la etapa 2 son nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos oxigenados (MWCNT).

20 Preferentemente, en la disolución enzimática de la etapa 3 se emplea el sistema bienzimático formado por la enzima LOD junto a la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP).

25 La plataforma electroquímica de elección para la preparación del biosensor amperométrico de lactato en la etapa 4, ha sido una plataforma serigrafiada de grafito (SPGE) desechable con un carácter pseudo basal, que permite un adecuado depósito de la matriz carbonosa conductora y, consecuentemente, una adecuada reproducibilidad en la inmovilización de la enzima LOD. Preferentemente, la plataforma serigrafiada utilizada puede ser de tipo convencional, de tipo microelectrodo, de tipo array, de tipo microarray, de tipo microbanda o tipo microbanda en serie. De esta forma se puede aplicar el biosensor a la determinación simultánea de varias muestras, o incluso realizar análisis con muy poca cantidad de muestra, confirmando versatilidad y rapidez al sistema.

30 Preferentemente, la etapa 6 de secado del biosensor para la eliminación del disolvente se puede llevar a cabo a 2-5 °C, o a 25 °C bajo condiciones de alto vacío durante 1 hora y después se almacena a 2-5 °C al aire.

35 Otro objeto de la invención se refiere a un nuevo biosensor amperométrico de lactato portable y desechable, obtenido por el procedimiento descrito anteriormente. El biosensor amperométrico de lactato obtenido utiliza plataformas electroquímicas serigrafiadas de grafito desechables, sobre las que se deposita una matriz carbonosa conductora compuesta de una combinación de un sistema enzimático que contiene al menos la enzima LOD, nanotubos de carbono funcionalizados y un biopolímero para la inmovilización de la enzima que dé estabilidad al biosensor, pero que sea biocompatible.

40 Otro objeto de la invención se refiere al uso del biosensor obtenido mediante el procedimiento descrito, para su aplicación en distintos medios complejos, incluidos los medios de cultivo embrionario utilizados en técnicas de reproducción asistida humana y otros medios utilizados en el desarrollo celular. El uso del biosensor amperométrico de lactato es también extrapolable a otros campos de aplicación como son el alimentario, donde el objeto de la aplicación del biosensor amperométrico de lactato sería la detección y determinación de lactato/ácido láctico en muestras provenientes del sector vinícola y cervecero; o en el campo deportivo, en el que el biosensor amperométrico de lactato abordaría la determinación de los niveles de lactato en sangre de los deportistas.

La introducción de las realizaciones preferentes descritas en el procedimiento persigue los siguientes objetivos:

- 5 (i) la mejora de la dispersión del biopolímero gracias a la combinación de los disolventes orgánicos, y así conseguir la mejora de la reproducibilidad a la hora del depósito de la disolución mediadora,
- (ii) la optimización de la cantidad de los productos con el fin de reducir el coste consiguiendo el mismo rendimiento y
- 10 (iii) mejorar la estabilidad del biosensor amperométrico evitando el posible deterioro del sustrato carbonoso del electrodo de trabajo debido a un alto porcentaje de DMF.

15 El procedimiento de preparación del biosensor amperométrico de lactato descrito y el uso del sistema híbrido compuesto por biopolímero y nanotubos de carbono funcionalizados, proporciona una serie de ventajas frente a los biosensores conocidos hasta el momento:

- a. Se consigue una interacción interfacial fuerte que mejora la estabilidad y robustez mecánica del biosensor.
- 20 b. El biosensor es biocompatible y no tóxico. Esto permite su uso para la medida in situ durante el crecimiento celular de embriones humanos.
- c. Se reduce la velocidad de degradación del biosensor. El biosensor es estable durante al menos 4 meses a una temperatura de 4 °C sin necesidad de protegerlo con ningún tipo de membrana, gel o disolución.
- 25 d. Permite medir la concentración de lactato en tiempo real, en medios de cultivo embrionario usados en técnicas de reproducción asistida, después de la retirada del embrión.
- e. El biosensor se puede preparar sobre distintos tipos de plataformas con diferentes diseños como convencional, micro electrodo, array, microarray, 30 microbanda o microbanda en serie

El uso de biopolímeros biocompatibles como quitosano, almidón, quitina, ácido hialurónico, glucógeno o celulosa, también contribuyen a mejorar notablemente la estabilidad del biosensor amperométrico de lactato, consiguiéndose la retención de la actividad del biosensor tras 4 meses de almacenamiento entre 2-5 °C. Esto se convierte en un gran adelanto sobre los biosensores descritos en la bibliografía hasta el momento.

Debido al sistema bienzimático empleado es posible la realización de la medida a un potencial de -0.2 V frente a un electrodo de referencia formado por una pasta de plata y cloruro de plata, con lo que se consigue evitar la interferencia de sustancias electroactivas presentes en los medios de cultivo embrionario.

Todas estas ventajas se consiguen gracias al uso del biopolímero, el uso de la plataforma serigrafiada de grafito pseudo basal utilizada para la fabricación del biosensor de lactato, la etapa de secado del sistema híbrido nanotubos de carbono/biopolímero/enzima y un almacenamiento más simple del biosensor de lactato. Además, el biosensor amperométrico descrito no necesita estar protegido con una película de naturaleza acuosa u orgánica (por ejemplo, membrana, gel, o disolución) para un almacenamiento estable del biosensor, lo que lo diferencia de algunos de los conocidos actualmente y le confiere un nuevo valor añadido.

## 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1:** Biosensor amperométrico de lactato. Esquema de la plataforma serigrafiada



desechable mostrando: 1) los nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos oxigenados, 2) ferroceno metanol (FcMe), 3) la enzima HRP, 4) la enzima LOD, 5) biopolímero, 6) lactato, 7) contraelectrodo, 8) electrodo de referencia y 9) electrodo de trabajo.

5

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

La invención describe un nuevo procedimiento para la preparación de un biosensor amperométrico para la determinación de lactato portable y desechable utilizando plataformas electroquímicas serigrafiadas de grafito, así como el biosensor obtenido por dicho procedimiento. El biosensor descrito se puede utilizar en diversas aplicaciones para la determinación de lactato/ácido láctico en distintos medios, incluidos los medios de cultivo embrionario y otros medios utilizados en el desarrollo celular.

15

El procedimiento para la preparación del biosensor amperométrico de lactato está formado por las siguientes etapas:

### 1. Dispersión del biopolímero en disolvente orgánico.

20

En primer lugar se dispersaron 84 mg de biopolímero en 1 mL de dimetilformamida (DMF) bajo un campo de ultrasonidos (baño ultrasónico de limpieza (ultrasons-H selecta)) durante 30 minutos. A esta dispersión se le denomina A.

25

### 2. A la dispersión anterior se adicionan un mediador y nanotubos de carbono, para dar lugar a la disolución mediadora.

30

A 50  $\mu$ L de la dispersión A se le adicionaron 5 mg del mediador ferroceno metanol (FcMe) (Aldrich  $\geq$  97 %, España) y 1 mg de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos oxigenados (MWCNT) (DropSens, España). Gracias a la realización de un estudio de caracterización se sabe que el porcentaje atómico en carbono y oxígeno para el material de carbono MWCNT es del 91.1 % y del 8.9 %, respectivamente, con una relación de carbono/oxígeno de aproximadamente 10. Un análisis más completo de los materiales de MWCNT reveló la ausencia de otros elementos asociados con la síntesis, por lo que la pureza de estos materiales es muy alta, ya que está exento de materiales de carbono amorfo y catalizadores metálicos. Esta dispersión se sometió a un campo de ultrasonidos (baño ultrasónico de limpieza) durante 1 hora, a la cual se le denomina dispersión mediadora B. El resultado final es una dispersión con aspecto pastoso de color negro, debido a los MWCNTs. Con la finalidad de mejorar la reproducibilidad del biosensor amperométrico de lactato, se modifica la preparación de la disolución B de la siguiente manera: contiene 2.5 mg de MWCNTs, 12.5 mg de FcMe y 5.25 mg de biopolímero dispersos en 500  $\mu$ L de una disolución orgánica 1:3 (v:v) de DMF-Etanol. La mezcla se dispersó mediante el uso de un baño de ultrasonidos durante una hora.

35

40

45

### 3. Preparación de la disolución enzimática disolviendo al menos la enzima LOD en una disolución tampón a pH neutro.

50

Por otro lado se prepara una disolución enzimática formada por 5 mg/mL de la enzima LOD, 0.5 Unidades de actividad por biosensor, la cual se encuentra almacenada a -20  $^{\circ}$ C, previamente disuelta en tampón fosfato 0.1 M; y 19 mg/mL de la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP) en 0.1 M de un tampón de fosfato sódico a pH 7.5 (disolución C).

**4. Adición de la disolución mediadora obtenida en la etapa 2 sobre la plataforma serigrafiada.**

5 Con una micropipeta se depositan 0.6  $\mu\text{L}$  de la dispersión mediadora B sobre la superficie de trabajo de la plataforma serigrafiada de grafito.

**5. Adición de la disolución enzimática obtenida en la etapa 3 sobre la plataforma serigrafiada y la disolución mediadora.**

10 Seguidamente se adicionan lentamente 5  $\mu\text{L}$  de la disolución enzimática C que contiene 0.5 unidades de la enzima LOD, sobre la matriz carbonosa anterior, de modo que se observe un cambio de color.

**6. Secado del biosensor para la eliminación del disolvente.**

15 Finalmente, la película formada sobre la superficie del electrodo se protege con una placa Petri de plástico y se deja secar a una temperatura entre 2-5  $^{\circ}\text{C}$ , o a 25  $^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones de alto vacío durante 1 hora y después se almacena al aire en una nevera  
20 entre 2-5  $^{\circ}\text{C}$ .

Como ya se ha indicado previamente, el biosensor obtenido por este procedimiento está formado por un sustrato de grafito serigrafiado soportado sobre un polímero aislante flexible (plataforma serigrafiada SPGE), una matriz carbonosa conductora formada por la  
25 combinación de un sistema enzimático que contiene al menos la enzima LOD, nanotubos de carbono funcionalizados y el biopolímero para la inmovilización de la enzima. Se puede observar un esquema del biosensor obtenido en la Figura 1. En ella se muestra la matriz carbonosa conductora con los nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos oxigenados (1), el mediador FcMe (2), el sistema bienzimático formado por la HRP (3) y la LOD (4) y el biopolímero (5). La matriz carbonosa está depositada sobre la  
30 plataforma serigrafiada que contiene el contraelectrodo (7), el electrodo de referencia (8) y el de trabajo (9). Sobre este biosensor se deposita la muestra con lactato (6) a determinar.

Más concretamente, para la fabricación del biosensor se emplea una plataforma electroquímica serigrafiada desechable. Estas plataformas consisten en un electrodo de trabajo de grafito de carácter basal con un diámetro de 3.1 mm, un contraelectrodo de grafito y un pseudo-referencia formado por una pasta de plata/cloruro de plata, todos los electrodos soportados sobre una base de poliestireno. La fabricación de las plataformas se lleva a cabo serigrafiando una tinta de carbono sobre una lámina flexible de poliestireno para definir los  
35 contactos, el contraelectrodo y el electrodo de trabajo. Esta lámina se seca en una estufa a 60 grados durante 30 minutos. Después se incorpora el electrodo de referencia serigrafiando una pasta de Ag/AgCl sobre el sustrato de plástico y se seca a 60 grados durante 30 minutos. Posteriormente se imprime con una pasta de dieléctrico para cubrir las conexiones y definir el electrodo de trabajo gráfico.  
45

En cualquier caso, transcurrido un mínimo de unas 12 horas de su preparación, el biosensor amperométrico de lactato está listo para su uso.

50 En primer lugar, se realiza un acondicionamiento previo del biosensor amperométrico sumergiendo el biosensor en una disolución tamponada de fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.5 durante 5 minutos bajo agitación magnética, para una correcta limpieza. Posteriormente se realiza un pretratamiento electroquímico del biosensor durante 2 minutos aplicando al

biosensor un potencial de -0.2 V en fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5. Una vez finalizado el pretratamiento el biosensor está listo para realizar la medida.

5 La medida se puede llevar a cabo mediante dos técnicas electroquímicas convencionales. La primera de ellas es la voltamperometría cíclica. Para ello, se coloca una gota de la disolución patrón o problema a medir con el fin de que cubra los tres electrodos presentes en la plataforma serigrafiada y a continuación se aplica un barrido lineal de potencial frente al tiempo desde -0.1 V hasta -0.4 V y se toma el valor de intensidad de corriente a un potencial de -0.2 V. Para la construcción de la recta de calibrado, se realiza la medida a  
10 distintas concentraciones de lactato. La otra técnica electroquímica es la cronoamperometría. En esta técnica se sumerge el biosensor en un vaso que contiene 7 mL de tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5, con agitación magnética, se aplica un potencial constante de -0.2 V y se adiciona un volumen conocido de una disolución que contiene lactato que se desea determinar. Para la construcción de la recta de calibrado se van  
15 adicionando 25  $\mu$ L de una disolución de lactato sódico 10 mM durante la cronoamperometría para posteriormente relacionar los valores de intensidad de corriente obtenidos con las distintas concentraciones de lactato.

#### 20 **EJEMPLO 1. Preparación de un biosensor amperométrico de lactato basado en un sistema híbrido MWCNT/LOD/biopolímero quitosano.**

Se prepararon una serie de biosensores amperométricos de lactato mediante el procedimiento presentado: primero se preparó una disolución que contenía 84 mg de quitosano en 1 mL de dimetilformamida y se aplicó un campo de ultrasonidos durante 30  
25 minutos (disolución A). De la disolución anterior (disolución A) se tomaron 50  $\mu$ L sobre los cuales se adicionaron 5 mg de FcMe y 1 mg de MWCNT. Esta nueva disolución se mantuvo durante una hora en un baño de ultrasonidos (disolución B). Paralelamente se preparó la disolución bienzimática en un tubo eppendorf que contenía 20  $\mu$ L de una disolución enzimática de 2 unidades de la enzima lactato oxidasa LOD en tampón 0.1 M fosfato de sodio pH 7.5, previamente almacenado a -20 °C, y se incorporó 0.5 mg de la enzima peroxidasa HRP (disolución C). Estas cantidades corresponden a una disolución para la  
30 preparación de 4 biosensores amperométricos de lactato.

Una vez preparadas la disolución mediadora (disolución B) y la enzimática (disolución C) se depositaron, sobre una plataforma serigrafiada con un electrodo de trabajo grafitico que presentaba un carácter pseudo basal. Para ello, se depositaron 0.6  $\mu$ L de la disolución B con el fin de recubrir completamente la superficie del electrodo de trabajo y seguidamente, sobre este depósito, se incorporaron 5  $\mu$ L de la disolución C, lentamente. Finalizado este proceso, los biosensores amperométricos de lactato se sometieron al proceso de secado y se  
35 almacenaron entre 2-5 °C al aire dentro de una placa Petri. Los biosensores amperométricos de lactato se testearon con el tiempo una vez preparados.

Antes de realizar la medida de corriente-tiempo correspondiente al experimento de cronoamperometría en función de las concentraciones de lactato de sodio, el biosensor amperométrico de lactato se sumergió en una disolución de 0.1 M de tampón fosfato de sodio con un pH de la disolución de 7.5, bajo agitación continua durante 5 minutos para su correcta limpieza. Posteriormente se realizó un pretratamiento electroquímico durante dos minutos a -0.2 V frente a un electrodo de pseudo referencia constituido por una pasta de plata y cloruro de plata en una disolución tampón fosfato de sodio 0.1 M a un pH 7.5 y, por  
45 último, se llevó a cabo la determinación de lactato mediante la técnica de cronoamperometría a un potencial constante de -0.2 V frente al electrodo de pseudo referencia, adicionando sucesivas alícuotas de una disolución estándar de lactato de sodio con una concentración de 10 mM en un tampón fosfato de sodio 0.1 M a un pH 7.5. Las  
50

rectas de calibrado se llevaron a cabo tomando el valor substraído de la intensidad de corriente a -0.2 V obtenido para cada una de las concentraciones de lactato adicionadas sobre la disolución de tampón de fosfato de sodio 0.1 M a un pH de 7.5, a la intensidad de corriente a un mismo potencial en ausencia de lactato de sodio en la disolución frente a la concentración de lactato de sodio en la disolución. Las rectas de calibrado presentaron valores de correlación comprendidos entre 0,995 y 0,999 en un rango de concentración entre 0.01 y 0.20 mM de lactato.

Se realizó un estudio sobre cómo afectan algunos de los posibles interferentes presentes en medios de cultivo embrionario utilizados en técnicas de reproducción asistida. Entre los candidatos examinados se eligieron la glucosa, la proteína de suero bovino BSA y piruvato. Los resultados obtenidos revelaron que la determinación de lactato de sodio mediante el uso del biosensor amperométrico de lactato obtenido es independiente de la presencia de los interferentes descritos anteriormente.

El uso de plataformas electroquímicas de tipo array o microarray también puede ser útil como biosensor amperométrico de lactato, ya que permite su uso en la determinación simultánea de varias muestras biológicas y le confiere versatilidad y rapidez al sistema analítico. Finalmente la fabricación del biosensor amperométrico de lactato se puede realizar utilizando plataformas electroquímicas serigrafiadas tipo microelectrodo, microbanda o microbanda en serie para determinar la concentración de lactato en medios de cultivo embrionario cuyos volúmenes oscilan entre 25 y 50 microlitros lo que permite realizar determinaciones con muy poca cantidad de muestra.

## **EJEMPLO 2: Uso del biosensor amperométrico de lactato en medios de cultivo embrionario.**

Para la validación del uso del biosensor amperométrico de lactato en medios de cultivo embrionarios, se empleó un medio de cultivo embrionario G-1 (vitrolife) y se comparó la determinación de la concentración de lactato en el medio de cultivo obtenida mediante una técnica cromatográfica HPLC-UV-Vis con la obtenida mediante el uso del biosensor amperométrico descrito en la invención.

Para la determinación de lactato por método cromatográfico se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta presión HPLC (Agilent 1100 series, Santa Clara, USA) con un detector ultravioleta visible. La fase móvil consistió en una disolución acuosa 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ajustando el pH de la disolución con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  hasta pH 2.5. La columna empleada fue una C18 hypersil y la velocidad de flujo fue de  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  con una longitud de onda de 210 nm. Se realizó una recta de calibrado utilizando patrones de lactato de sodio preparados con la misma fase móvil. Todos los patrones de lactato se filtraron utilizando los filtros con un tamaño de poro de 0.5 micras. Se realizó una dilución 1:10 (v/v) de la muestra problema (medio de cultivo) en agua y posteriormente se filtró. El valor de la concentración de lactato para la muestra empleada mediante el método cromatográfico HPLC-UV-Vis fue de  $11,9 \pm 0,10 \text{ mM}$ .

Una vez determinado el valor de concentración de lactato mediante la técnica cromatográfica utilizando el HPLC-UV-Vis se realizaron las medidas de lactato en la muestra problema (medio de cultivo) mediante el empleo del biosensor amperométrico de lactato. El biosensor empleado en este caso fue el biosensor fabricado de acuerdo con la realización preferente del procedimiento descrito, utilizando una mezcla de DMF y etanol como disolvente para el quitosano y secando el biosensor a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en condiciones de alto vacío. Se prepararon 8 biosensores amperométricos de lactato y se emplearon 4 de ellos para la

realización de la recta de calibrado y los otros 4 restantes para la medida de lactato en la muestra problema.

5 La medida de lactato en la muestra problema de medio de cultivo se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, se realizó limpieza del biosensor de la manera indicada anteriormente, posteriormente se introdujo el biosensor en un vial que contenía 5 mL de tampón fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.5 y la determinación de lactato se llevó a cabo empleando la técnica de cronoamperometría, a un potencial constante de  $-0.2$  V. Tras dos minutos de pretratamiento se adicionan 60  $\mu$ L del medio de cultivo embrionario G1. Se registró el valor de intensidad obtenido y mediante la recta de calibrado obtenida  
10 anteriormente se calculó la concentración de lactato en el medio de cultivo. Para cada determinación de lactato en el medio de cultivo se utilizaron 4 biosensores desechables. Se realizaron tres medidas de la concentración de lactato en el medio de cultivo elegido en tres días diferentes, y las medias de las concentraciones junto con sus respectivas desviaciones estándar fueron  $11.5 \pm 2.0$  mM,  $12.2 \pm 1.8$  mM y  $11.8 \pm 1.7$  mM, respectivamente.  
15

Los test de estabilidad de los biosensores amperométricos de lactato se realizaron una vez preparados siguiendo la realización preferente del procedimiento y transcurridos 8 días, 14 días, y 4 meses, respectivamente. Los biosensores amperométricos de lactato empleados a día 1 de su preparación presentaron una recta de calibrado con una regresión lineal de 0.99932 siendo la pendiente de  $-0.0034 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1} \pm 0.0002 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ . Después de los 14 días transcurridos de la preparación de los biosensores, éstos presentaron unas rectas de calibrado con una regresión lineal de 0.99579 y 0.99839, sin ninguna pérdida de la sensibilidad del biosensor amperométrico de lactato. Finalmente, pasados 4 meses tras la preparación de los biosensores se realizó una nueva recta de calibrado, comprobando que los biosensores seguían siendo válidos para su empleo en la determinación de lactato, a pesar de que la sensibilidad del biosensor amperométrico de lactato se redujo en un 10-20%.  
20  
25

### 30 **EJEMPLO 3. Preparación de un biosensor amperométrico de lactato basado en un sistema híbrido MWCNT/LOD/biopolímero almidón, quitina, ácido hialurónico, glucógeno o celulosa.**

La detección y determinación de lactato empleando el uso de diferentes biopolímeros para la fabricación del biosensor amperométrico de lactato se llevó a cabo de la siguiente manera.  
35

El ensayo se realizó con el biosensor fabricado de acuerdo con la realización preferente del procedimiento descrito, utilizando una mezcla de DMF y etanol 1:3 v:v como disolvente para el mediador FcMe, los MWCNTs y el biopolímero. En este ejemplo se han utilizado los distintos biopolímeros mencionados: almidón, quitina, ácido hialurónico, glucógeno y celulosa, respectivamente. La anterior dispersión se sonicó durante 1 hora. Paralelamente se preparó la disolución enzimática que contenía la enzima LOD y la HRP. Una vez depositadas la dispersión mediadora correspondiente y la disolución enzimática, se realizó el proceso de secado a  $25$  °C en condiciones de alto vacío durante 1 hora, y posterior almacenamiento a  $2-5$  °C al aire. Se realizaron rectas de calibrado para cada biosensor amperométrico de lactato correspondiente a los sistemas híbridos MWCNT/LOD/almidón, MWCNT/LOD/quitina, MWCNT/LOD/ácido hialurónico, MWCNT/LOD/glucógeno y MWCNT/LOD/celulosa.  
40  
45

Una vez fabricados los biosensores amperométricos de lactato, se llevó a cabo la limpieza del biosensor de la manera indicada anteriormente en el procedimiento y seguidamente, se introdujo el biosensor en un vial que contenía 5 mL de tampón fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.5. La determinación de lactato se llevó a cabo empleando la técnica de  
50

5 cronoamperometría, a un potencial constante de  $-0.2$  V respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Tras dos minutos de pretratamiento se fueron adicionando  $25$   $\mu$ L de lactato sódico en tampón fosfato de sodio a pH 7.5. Se registraron los valores de intensidad de corriente obtenidos con cada adición de alícuota de la disolución de lactato. Las rectas de calibrado obtenidas con los biosensores amperométricos de lactato fabricados con los distintos biopolímeros, presentaron los siguientes rangos de linealidad y coeficientes de regresión lineal:

10 **Tabla 1:** Linealidad obtenida con diferentes biosensores amperométricos de lactato obtenidos mediante el procedimiento descrito y utilizando distintos biopolímeros.

Biopolímero	Rango de linealidad ( $\mu$ M)	Coefficiente de regresión lineal
Almidón	50-300	0.995
Quitina	50-250	0.997
Ácido hialurónico	5-250	0.995
Glucógeno	5-300	0.997
Celulosa	5-250	0.997

Todos los biosensores amperométricos de lactato desechables presentaron una alta estabilidad mecánica y enzimática.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) que comprende las siguientes etapas:
  1. Dispersión del biopolímero en disolvente orgánico.
  2. A la dispersión anterior se adicionan un mediador y nanotubos de carbono, para dar lugar a la disolución mediadora.
  - 10 3. Preparación de la disolución enzimática disolviendo al menos la enzima LOD en una disolución tampón a pH neutro.
  4. Adición de la disolución mediadora obtenida en la etapa 2 sobre una plataforma serigrafiada.
  5. Adición de la disolución enzimática obtenida en la etapa 3 sobre la plataforma serigrafiada y la disolución mediadora.
  - 15 6. Secado del biosensor para la eliminación del disolvente.
2. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde el biopolímero utilizado es quitosano.
- 20 3. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde el biopolímero utilizado está basado en polisacáridos de glucosa o amilosa, funcionalizados con grupos hidroxilo, amino, acetilo o carboxílico, que contienen enlaces glucosídicos, como son el almidón, la quitina, el ácido hialurónico, el glucógeno y la celulosa.
- 25 4. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde el disolvente orgánico es dimetilformamida o una combinación de dimetilformamida y etanol.
- 30 5. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 4, donde la combinación de dimetilformamida y etanol es en proporción 1:3 (v:v).
- 35 6. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde el mediador utilizado es el ferroceno metanol.
- 40 7. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde los nanotubos de carbono utilizados son de pared múltiple y están funcionalizados con grupos oxigenados.
- 45 8. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde la disolución enzimática se prepara con la enzima lactato oxidasa (LOD), junto a la enzima peroxidasa de rábano silvestre (HRP).
- 50 9. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde la plataforma serigrafiada es de grafito desechable, de tipo convencional, microelectrodo, array, microarray, microbanda o microbanda en serie, para conferir versatilidad y rapidez al sistema.
10. Procedimiento de preparación de un biosensor amperométrico de lactato según la reivindicación 1, donde el secado se realiza a 2-5 °C o a 25 °C bajo condiciones de alto vacío durante 1 hora y después se almacena a 2-5 °C al aire.

- 5 11. Biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) obtenido por el procedimiento descrito en la reivindicación 1, formado por un sustrato de grafito serigrafiado soportado sobre un polímero aislante flexible, una matriz carbonosa conductora formada por la combinación de un sistema enzimático que contiene al menos la enzima LOD, nanotubos de carbono funcionalizados y el biopolímero para la inmovilización de la enzima.
- 10 12. Uso del biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) descrito en la reivindicación 11 en medios complejos, incluidos los medios de cultivo embrionario utilizados en técnicas de reproducción asistida humana y otros medios utilizados en el desarrollo celular.
- 15 13. Uso del biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) descrito en la reivindicación 11 en muestras alimentarias provenientes del sector vinícola y cervecero.
- 20 14. Uso del biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) descrito en la reivindicación 11 en la determinación de los niveles de lactato en sangre.



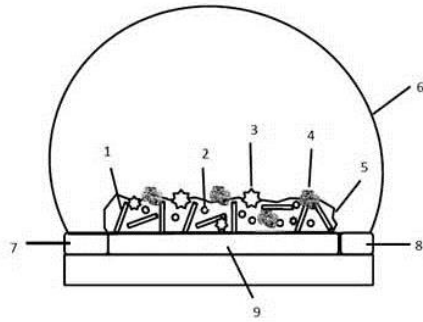


Fig. 1



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201431875  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 18.12.2014  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/25** (2006.01)  
**G01N27/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PÉREZ SANDRA et al. "Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples" The Analyst England 21 Agosto 2012 21.08.2012 VOL: 137 No: 16 Págs: 3854-3861 ISSN 1364-5528 (Electronic) Doi: doi:10.1039/c2an35227c pubmed:22763889; todo el documento.	1-14
A	RASTISLAV MONOK et al. "A rapid method for determination of-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite" FOOD CONTROL, 20110720 BUTTERWORTH, LONDON, GB 20.07.2011 VOL: 23 No: 1 Págs: 238-244 ISSN 0956-7135 Doi: doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.021; todo el documento.	1-14
A	PAZ ZANINI V et al. "An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite-chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples" Sensors and Actuators: B Chemical 5 Julio 2011 Elsevier Sequoia S.A. Switzerland 05.07.2011 VOL: 155 No: 1 Págs: 75-80 ISSN 0925-4005 (print) Doi: doi:10.1016/j.snb.2010.11.026; todo el documento.	1-14
A	RASSAEI L et al. "Lactate biosensors: Current status and outlook" Analytical and Bioanalytical Chemistry - A critical review on DART-MS/Characterization of carbon aerosol particles/Nanomaterials in sample preparation for protein analysis/Biomarkers for autoimmune and carcinogenic diseases 2013 Enero 2014 Springer Verlag deu (2014) VOL: 406 No: 1 Págs: 123-137 ISSN 1618-2642 (print) ISSN 1618-2650 (electronic) Doi: doi:10.1007/s00216-013-7307-1; todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
09.04.2015

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, COMPENDEX/EI, INSPEC/IEE, NPL, y bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.04.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PÉREZ SANDRA et al. "Amperometric bienzymatic biosensor for L-lactate analysis in wine and beer samples" The Analyst England 21 Agosto 2012 21.08.2012 VOL: 137 No: 16 Págs: 3854-3861 ISSN 1364-5528 (Electronic) Doi: doi:10.1039/c2an35227c pubmed:22763889.	21.08.2012
D02	RASTISLAV MONOK et al. "A rapid method for determination of-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite" FOOD CONTROL, 20110720 BUTTERWORTH, LONDON, GB 20.07.2011 VOL: 23 No: 1 Págs: 238-244 ISSN 0956-7135 Doi: doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.021.	20.07.2011
D03	PAZ ZANINI V et al. "An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite-chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples" Sensors and Actuators: B Chemical 5 Julio 2011 Elsevier Sequoia S.A. Switzerland 05.07.2011 VOL: 155 No: 1 Págs: 75-80 ISSN 0925-4005 (print) Doi: doi:10.1016/j.snb.2010.11.026.	05.07.2011
D04	RASSAEI L et al. "Lactate biosensors: Current status and outlook" Analytical and Bioanalytical Chemistry - A critical review on DART-MS/Characterization of carbon aerosol particles/Nanomaterials in sample preparation for protein analysis/Biomarkers for autoimmune and carcinogenic diseases 2013 Enero 2014 Springer Verlag deu (2014) VOL: 406 No: 1 Págs: 123-137 ISSN 1618-2642 (print) ISSN 1618-2650 (electronic) Doi: doi:10.1007/s00216-013-7307-1.	30.11.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14, es un procedimiento para la preparación de un biosensor amperométrico de lactato basado en la enzima lactato oxidasa (LOD) (reiv. 1-10), el biosensor obtenido por dicho procedimiento (reiv. 11) y el uso del biosensor en medios complejos (reiv. 12-14).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga un biosensor amperométrico bienzimático de lactato y su procedimiento de obtención. El biosensor se basa en la incorporación de las enzimas lactato oxidasa (LOD) y la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) en una membrana de nanotubos de carbono y polisulfona, sobre una plataforma serigrafiada. Para aumentar la sensibilidad del biosensor, se incorpora ferroceno en la membrana como mediador redox. Este biosensor tiene aplicación en el análisis de lactato en muestras alimentarias del sector vinícola y cervecero.

El documento D02 divulga un biosensor amperométrico de lactato. Este biosensor consiste en nanotubos de carbono de pared múltiple junto con quitosano. El procedimiento de obtención del biosensor incluye el depósito de los nanotubos de carbono sobre un electrodo y la posterior inmovilización de las enzimas lactato oxidasa y la peroxidasa HRP intercaladas entre las capas de quitosano (ver Fig. 1). Como mediador utiliza la ferrocianida. Este biosensor tiene aplicación en el análisis de lactato en muestras alimentarias y del sector vinícola.

El documento D03 divulga un biosensor basado en la inmovilización de la enzima lactato oxidasa en un electrodo modificado con un hidrogel de quitosano y laponita. Como mediador utiliza el ferroceno metanol. Este biosensor tiene utilidad en la detección de lactato en productos lácteos y en muestras alimentarias del sector vinícola y cervecero.

El documento D04 divulga varios tipos de biosensores de lactato, entre ellos biosensores amperométricos basados en la enzima lactato oxidasa. En este documento se indica que para aumentar la sensibilidad de los biosensores se puede incrementar el área del electrodo, por ejemplo mediante el uso de nanotubos de carbono, o mediante el uso de un sistema bienzimático, como por ejemplo la inmovilización de la peroxidasa HRP junto con la lactato oxidasa. En este caso, la peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno producido por la acción de la lactato oxidasa, para dar agua. En este documento también se indica que la interacción molecular de la enzima con la matriz, incrementa la estabilidad del sensor, por ejemplo mediante la utilización de hidrogeles de quitosano (ver apartado "Electrochemical sensors: Amperometric lactate sensors").

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica al objeto de la invención. Como ya se ha indicado anteriormente, este documento divulga un biosensor similar al de la invención. Las diferencias entre ambos radican en la utilización de distintos polímeros (polisulfona frente a quitosano) y distintos mediadores (ferroceno frente a su derivado, el ferroceno metanol), además de la incorporación de una última etapa de secado del biosensor en el procedimiento de la invención.

Aunque en el estado de la técnica ya se conoce la idoneidad de la utilización del quitosano y de mediadores redox para la fabricación de biosensores (ver documentos D02-D04), para un experto en la materia no resultaría obvio combinar los distintos componentes tal y como se indica en la presente solicitud de patente y obtener el biosensor objeto de la invención con una expectativa razonable de éxito sin una experimentación previa, teniendo en cuenta además que en el documento D01 se indica que tras incorporar una etapa de secado al procedimiento de obtención del biosensor divulgado, éste perdió casi toda su actividad (un 90%) (ver apartado "*Storage stability and linear interval range*" del documento D01).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica D01-D04, la invención contenida en las reivindicaciones 1-14 es con referencia a dichos documentos nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).