

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003, 69:

Artículo original

## Optimización de la inmovilización de glucosa oxidasa en microgeles de poliacrilamida\*.

JORGE RUBIO RETAMA, ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS<sup>1</sup>,  
BEATRIZ LÓPEZ-RUIZ

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.*

### RESUMEN

Se propone la síntesis de microgeles de poliacrilamida usando el método de polimerización en emulsión (W/O) concentrada, sin y con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* atrapada en su red polimérica. En las micropartículas sin enzima se estudió la influencia del agente iniciador en la temperatura máxima de polimerización y el grado de conversión del monómero en función del tiempo. Como resultado de la polimerización se obtuvieron en todos los casos micropartículas esféricas con un tamaño comprendido entre 2,5 $\mu$ m y 6,2 $\mu$ m de diámetro. En los microgeles con enzima se estudió la influencia del agente reticulante en diversos parámetros cinéticos. La utilización de las micropartículas con enzima como material biológico de un biosensor amperométrico permitió evaluar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa atrapada en su red polimérica. La actividad catalítica del enzima atrapado se vio afectada por el grado de reticulación del microgel y como consecuencia la respuesta del biosensor sobre la que también influye la cantidad de micropartículas inmovilizadas en la superficie del electrodo que actúa como transductor del biosensor.

**Palabras Clave:** Síntesis de microgeles.— Emulsión concentrada glucosa oxidasa.— Inmovilización en microgeles de poliacrilamida.

---

\* Premio Carlos del Castillo Leiva 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia

<sup>1</sup> *Departamento de Química-Física Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.*

### SUMMARY

#### Optimization of glucose oxidase entrapment in polyacrylamide microgels

The synthesis of polyacrylamide microgels using the concentrated emulsion pathway (W/O), without and with entrapped glucose oxidase from *Aspergillus niger* is proposed. The effect of initiator concentration in the maximum temperature of polymerization and the conversion rate of the monomer as a function of time were studied in the microparticles without enzyme. As a result of the polymerization, spherical microparticulas were obtained in all the cases with a range of size between 2.5  $\mu\text{m}$  and 6.2  $\mu\text{m}$  of diameter. In the microgels with enzyme the effect of the cross-linking content in the kinetic parameters was studied. The use of the microgels with enzyme as the biological material of an amperometric biosensor allowed to evaluate the enzymatic activity of the glucose oxidase entrapped in the polymer. The catalytic activity of the entrapped enzyme and the biosensor response were affected by the cross-linking content of the microgel. The biosensor response was also affected by the quantity of microparticles immobilized in the surface of the electrode that acts as transducer of the biosensor.

**Key words:** Synthesis of microgels.— Concentrated emulsion.— Glucose oxidase.— Entrapment in polyacrylamide microgels.

### INTRODUCCIÓN

En farmacia, medicina y biotecnología se han desarrollado un gran número de aplicaciones de las micropartículas de polímeros hidrofílicos. De todas ellas, la inmovilización de enzimas en estos sistemas ha sido intensamente investigada en los últimos años. La utilización de microgeles permite obtener sistemas con una gran relación superficie/volumen en la que poder unir o atrapar un enzima, que reaccionará posteriormente con un sustrato. Estos sistemas presentan una excelente estabilidad debido a que el enzima está protegido por la matriz polimérica, preservando su actividad durante largos períodos de tiempo. Son muchas las técnicas de inmovilización que se han descrito en los últimos años, de todas ellas destacamos el método de atrapamiento a partir de la polimerización desde emulsiones concentradas, que ha sido propuesto como un método idóneo para llevar a cabo la inmovilización de gran variedad de enzimas [1-6]. Este método consiste en preparar una emulsión (W/O) con una fase acuosa superior al 75% del volumen total de la emulsión [7-12]. En este tipo de emulsiones, las gotas dispersadas forman estructuras poliédricas separadas por una pequeña película de fase

oleosa. En el interior de estas estructuras poliédricas se produce la polimerización al añadir el agente iniciador, atrapando, durante este proceso, cualquier sustancia previamente disuelta en la fase acuosa junto con los monómeros.

En este trabajo se ha estudiado de qué manera afectan ciertos elementos de la síntesis como la cantidad de iniciador, la proporción de agente reticulante, la velocidad de conversión del monómero, etc., a las propiedades físicas de las micropartículas obtenidas. Así mismo se ha estudiado cómo la estructura de estas micropartículas afecta a la actividad catalítica del enzima atrapado.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Aparatos

El tamaño de las micropartículas de poliacrilamida fue evaluado mediante microscopia electrónica de barrido SEM. Las micrografías fueron realizadas en un microscopio electrónico JOEL JSM-6400. Las muestras de micropartículas analizadas en microscopia SEM, fueron liofilizadas y sombreadas con oro depositado por un Sputter Coater Blazer (SCD-004). Las medidas amperométricas del biosensor se realizaron mediante un potenciostato Metrohm Polarecord modelo E-506 en una celda de tres electrodos, electrodo de platino como electrodo de trabajo, electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y electrodo de platino como electrodo auxiliar. Los potenciales están referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

### Reactivos

El monómero acrilamida (AA) fue suministrado por Panreac, el agente iniciador, persulfato de amonio, el acelerador de la polimerización, NNN'N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), el Span 80 así como el dodecano por Fluka. El agente reticulante NN' metilen-bis-acrilamida (BAC) fue proporcionado por Aldrich, el enzima glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* (E.C: 1.1.3.4.) 6.000 U/g por Sigma, la membrana de diálisis de corte 12.000-14.000 por Spectrum Medical Industries y la  $\beta$ -D-

glucosa por Merck. Todos estos reactivos fueron utilizados tal y como fueron recibidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Síntesis de microgeles

Los microgeles sin enzima se sintetizaron a partir de una emulsión concentrada (W/O) siguiendo las indicaciones encontradas en la bibliografía (13-15). La emulsión concentrada se realizó mediante goteo con una jeringuilla, de la fase acuosa sobre la fase continua oleosa. En la Tabla I se da la composición detallada de los constituyentes de la emulsión concentrada. La emulsión fue homogenizada mediante agitación magnética. El oxígeno disuelto en la emulsión se eliminó mediante el paso de nitrógeno.

$$\text{En esta emulsión } \phi = \frac{V_{aq}}{V_{oleo} + V_{aq}} = 0.86.$$

TABLA I. Composición de la emulsión concentrada.

<b>FASE OLEOSA</b>	<b>13,89%</b>
Dodecano	750µl
Span 80	250 µl
<b>FASE ACUOSA</b>	<b>86,11 %</b>
Agua bidestilada	5ml
Acrilamida	1.25g
NN´Metilen-bis-acrilamida	41 mg
Persulfato de amonio	25 mg
NNN´N´Tetrametil-ethylen-diamine	63 µl

Para comenzar la polimerización se añadió TEMED. Después de una hora de polimerización las micropartículas se precipitaron con metanol frío y se aislaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 10 °C. Posteriormente se lavaron las micropartículas con acetona. Para su conservación durante largos períodos de tiempo se liofilizaron y almacenaron a 4 °C. En la Figura 1 se pueden observar las micropartículas de poliacrilamida sin enzima obtenidas. Sus diámetros se encontraron comprendidos entre las 2,5  $\mu\text{m}$  y 7  $\mu\text{m}$ .

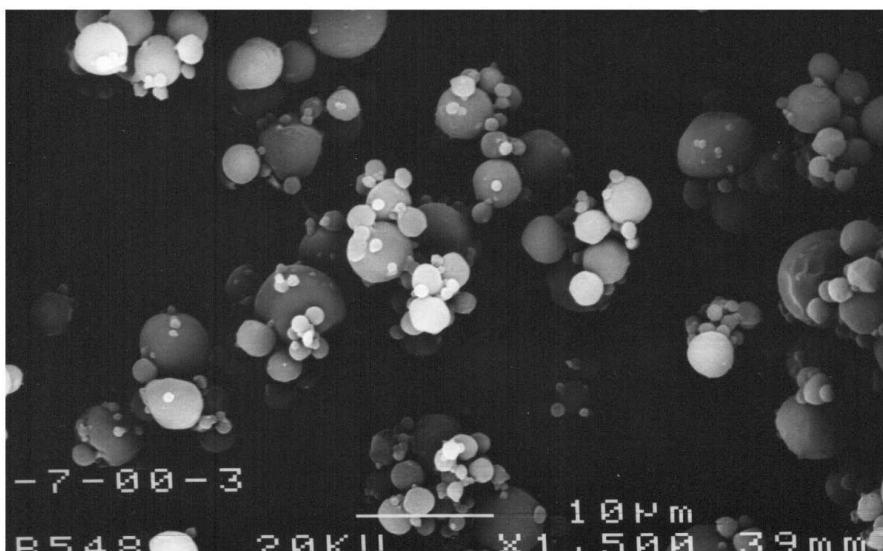


FIGURA 1.- Micrografía de micropartículas de poliacrilamida vacías

#### *Control de la temperatura de polimerización*

Un factor clave en la inmovilización de enzimas es la temperatura a la cual se realiza la polimerización. La reacción de polimerización es una reacción exotérmica cuya temperatura depende de la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. Por esta razón, se realizaron distintas síntesis variando la cantidad de iniciador desde 7 mM hasta 22 mM. La

Figura 2 muestra la temperatura de polimerización máxima ( $T_{\text{máx}}$ ), alcanzada al añadir diferentes concentraciones de iniciador.

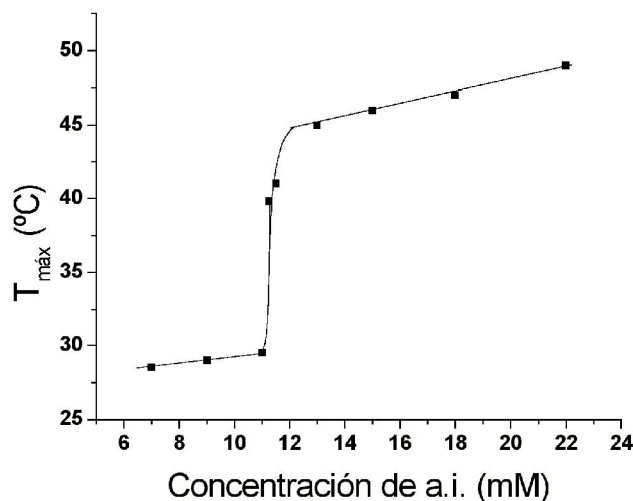


FIGURA 2.- Efecto de la cantidad de agente iniciador en la temperatura máxima de polimerización

La temperatura de polimerización aumenta al aumentar la concentración de iniciador, observándose un incremento brusco de la  $T_{\text{máx}}$  entre 11,5 mM y 14 mM de persulfato de amonio. Como consecuencia de estos resultados para las síntesis posteriores se seleccionó una concentración de iniciador de 11 mM, ya que a esta concentración la temperatura de polimerización no supera los 30 °C, temperatura inferior a la de desnaturalización de la glucosa oxidasa.

#### *Control del grado de polimerización*

Con el objetivo de mantener el mínimo tiempo al enzima en el medio de reacción, se estudió la cinética de la reacción de polimerización. Para ello se llenaron 10 viales con 250  $\mu\text{l}$  de emulsión concentrada. En cada vial se inició la polimerización a diferentes tiempos, parándose dicha reacción en todos los viales a la vez. El microgel resultante de la

polimerización se precipitó con metanol frío y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm, a continuación se secó en un horno a 100 °C durante 24 horas. Finalmente se pesó cada muestra anotando la cantidad de polímero obtenido con respecto al tiempo de reacción.

La Figura 3 muestra el grado de conversión del monómero cuando se utiliza una concentración de sulfato de amonio 11 mM. Como se puede observar en la gráfica el grado de conversión del monómero alcanza el 95 % una vez transcurridos 40 minutos de reacción. En las siguientes síntesis, pasado éste tiempo se dará por finalizada la reacción de polimerización.

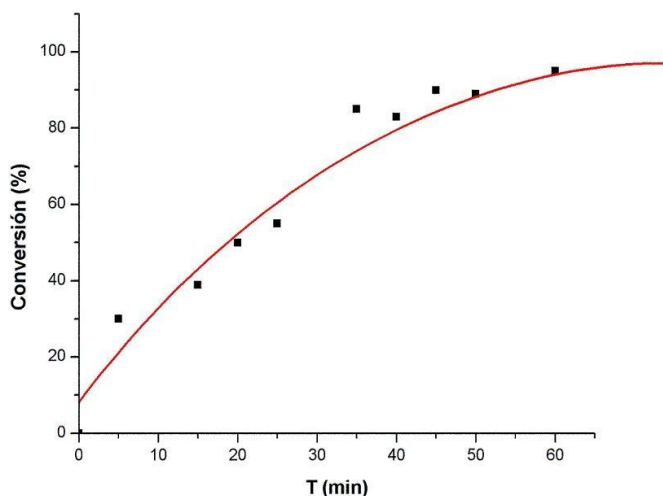


FIGURA 3. Grado de conversión del monómero en función del tiempo. Concentración de agente iniciador 11,5 mM

### Síntesis de microgeles con glucosa oxidasa en su interior

En la síntesis de microgeles de poliacrilamida con GOx en su interior se utilizó el método anteriormente descrito, con ligeras modificaciones. Se preparó una fase acuosa constituida por tampón fosfato 0,1 M pH 7,2, en la cual se disolvieron los precursores del polímero y 25 0µg de GOx. Para iniciar la polimerización se añadió

persulfato de amonio 11mM. Se realizaron distintas síntesis en las que se modificó la proporción de agente reticulante/monómero [ $\chi = \text{Ar(g)}/\text{M(g)} * 100$ ],  $\chi = 0,7 \%$ ;  $\chi = 1,6 \%$ ;  $\chi = 3,2 \%$ ;  $\chi = 5,2 \%$ . Después de 40 minutos de síntesis se lavaron las micropartículas con tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 frío y acetona, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. La Figura 4 muestra las micropartículas de poliacrilamida con GOx en su interior, con un diámetro comprendido entre las 3  $\mu\text{m}$  y 7  $\mu\text{m}$ .

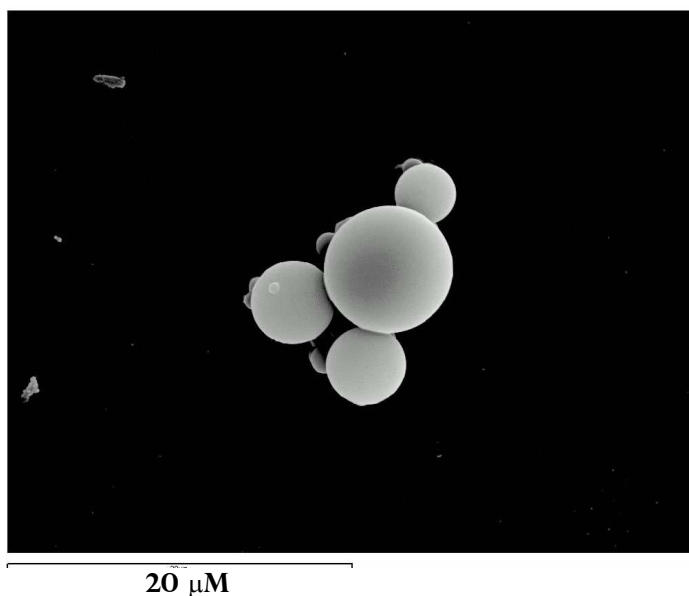


FIGURA 4. Micrografía de micropartículas de poliacrilamida con Gox en su interior

#### *Influencia del grado de reticulación en la actividad catalítica del enzima inmovilizado*

Para estudiar la actividad catalítica del enzima atrapado en el microgel se preparó un biosensor amperométrico de glucosa con un electrodo de platino como transductor y el microgel con enzima como componente biológico, en la Figura 5 se muestra un esquema del biosensor y del sistema de medida utilizado. Para su preparación se pesó 1 mg de micropartículas y se depositaron sobre la superficie del electrodo



de platino manteniéndose en contacto mediante una membrana de diálisis. Las medidas se realizaron a +0,6V vs SCE, este potencial permitió medir la oxidación del peróxido de hidrógeno formado en la reacción enzimática, las respuestas así obtenidas por el biosensor presentan una relación directa con la concentración de glucosa. Se utilizó una disolución tampón fosfato 0,1 M pH 7 como electrolito soporte sobre el que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa 0,05 M hasta llegar a la concentración de glucosa correspondiente a la saturación enzimática. Tras cada adición se midió la respuesta del biosensor y se trazó la curva de calibrado correspondiente (Fig. 6) a partir de la cual se calcularon los parámetros enzimáticos, velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_{m_{ap}}$ ).

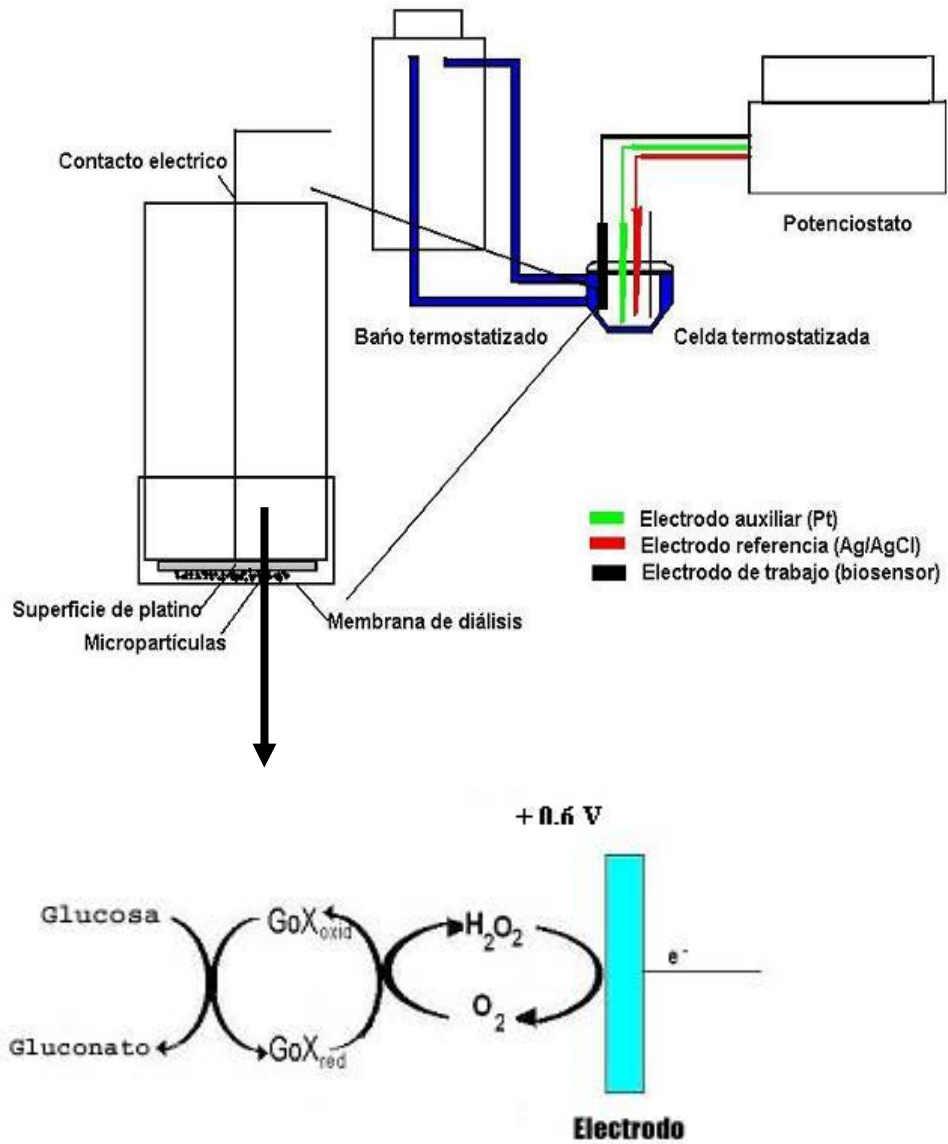


FIGURA 5. Esquema del sistema de medida que incluye un biosensor amperométrico

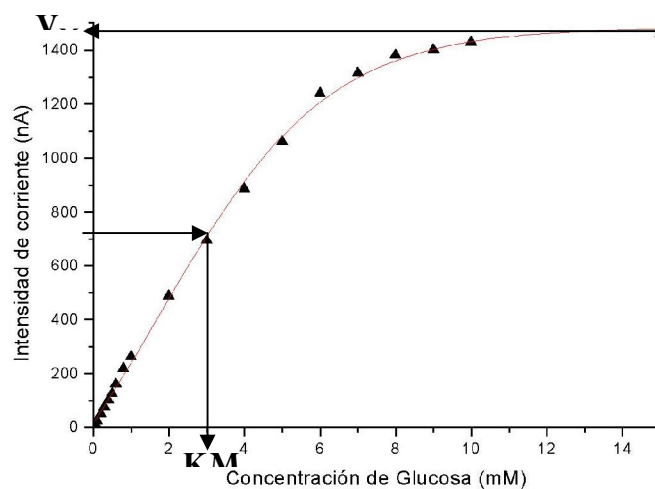


FIGURA 6. Curva de calibrado para la glucosa obtenida con el biosensor amperométrico

La Figura 7 muestra la evolución de  $V_{\max}$  y  $K_{m_{ap}}$  al aumentar el grado de reticulación ( $\chi$ ) del microgel.  $V_{\max}$  alcanza su máximo valor a  $\chi = 3,2\%$ . Grados de entrecruzamiento inferiores generan menores respuestas como consecuencia de la menor cantidad de enzima disponible en el medio de inmovilización. Este efecto se atribuye a la formación de una red polimérica poco reticulada, con poros tan grandes que permiten la pérdida del enzima, especialmente durante los lavados. Cuando el grado de reticulación es mayor que  $3,2\%$  el descenso de  $V_{\max}$  se puede atribuir a problemas difusionales del sustrato para alcanzar al enzima atrapado en la red polimérica, como consecuencia del alto grado de reticulación de la misma. Las micropartículas con  $\chi = 3,2\%$  presentan el máximo valor de  $V_{\max}$  debido a que la red se encuentra lo suficientemente reticulada como para no perder el enzima, pero sin llegar a dificultar el paso de sustratos hacia el interior de las micropartículas. Sin embargo,  $K_{m_{ap}}$  evoluciona de forma contraria, observándose un mínimo cuando  $\chi = 3,2\%$ . Estos resultados confirman que grados de reticulación bajos conllevan la pérdida de enzima y grados de reticulación elevados suponen, además de dificultades de difusión, impedimentos estéricos en los centros activos del enzima debidos al medio tan denso en el que se encuentran atrapadas.

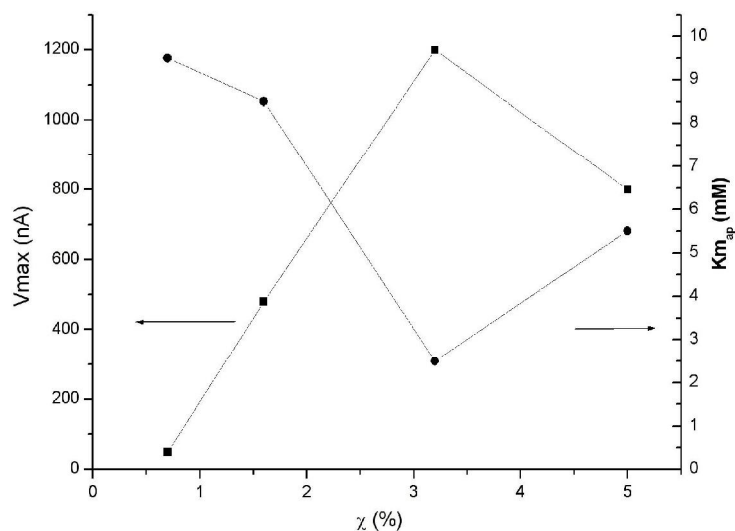


FIGURA 7. Influencia del grado de reticulación del microgel en la  $V_{max}$  y  $K_{m_{ap}}$  del enzima atrapado

*Influencia de la cantidad de micropartículas en la  $K_m$  aparente ( $K_{m_{ap}}$ ) del enzima inmovilizado*

Seleccionadas las micropartículas de  $\chi = 3,2\%$  se depositaron cantidades crecientes de las mismas sobre la superficie del electrodo, desde 1mg hasta 6mg. La Figura 8 muestra la variación de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_{m_{ap}}$  en función de la cantidad de micropartículas del biosensor amperométrico. En esta figura, se puede observar como ambos parámetros aumentan conforme lo hace la cantidad de micropartículas. Al aumentar la cantidad de micropartículas en el biosensor aumenta la cantidad de enzima disponible y por ello aumenta  $V_{max}$ , pero al aumentar el grosor y la compactación de la capa enzimática se dificulta la difusión de la glucosa hacia el interior de las micropartículas, lo que hace que la  $K_{m_{ap}}$  aumente. Al utilizar una cantidad de micropartículas de 1 mg en la preparación del biosensor se obtiene una  $K_{m_{ap}}$  muy similar a la del enzima en disolución (2,5 mM frente a 2 mM respectivamente).

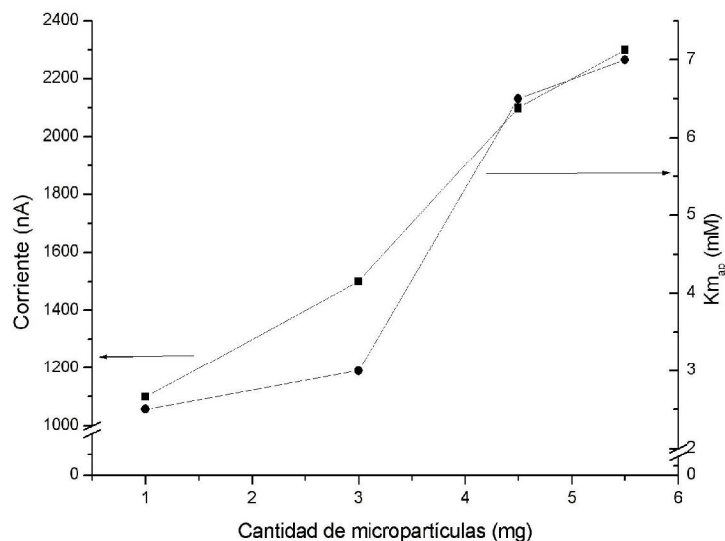


FIGURA 8. Influencia de la cantidad de micropartículas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo en la  $V_{max}$  y  $K_{m_{ap}}$  del enzima atrapado.

## CONCLUSIONES

En la síntesis de microgeles de poliacrilamida con persulfato de amonio de 11 mM la temperatura de la reacción no supera los 30 °C. Esta síntesis puede darse por concluida una vez transcurridos 40 minutos de reacción, tiempo en el que ha reaccionado el 95% del monómero. Las micropartículas así obtenidas presentan forma esférica con diámetros comprendidos entre las 2,5  $\mu\text{m}$  y 7  $\mu\text{m}$ , que apenas se ven afectados al incluir el enzima en la red polimérica.

Al utilizar estos microgeles como material biológico integrante de un biosensor amperométrico se observa que los de grado de reticulación  $\chi = 3,2\%$  presentan el máximo valor de  $V_{max}$  y mínimo de  $K_{m_{ap}}$  debido a que para este grado de reticulación se retiene el enzima, sin dificultar el paso del sustrato hacia el interior de la matriz polimérica. Cantidades altas de micropartículas depositadas sobre el electrodo dificultan la cinética enzimática.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de este trabajo a través del proyecto BMF-2000-0620, MAT2002-10233-E, MAT2003-03051-C03.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) OH J, NAM Y, LEE K, PARK T (1999) *J Control Release* 57:269
- (2) PIZARRO C, FERNANDEZ TORROBA MA, BENITO C, GONZALEZ SAINZ JM (1997) *Biotechnol Bioeng* 53:497
- (3) GALLARDO A, FERNÁNDEZ F, CIFUENTES A, DIEZ-MASA JC, BERMEJO P, REBUELTA M, LOPEZ BRAVO A, SAN ROMAN J (2001) *J Control Release* 72:1
- (4) ORTEGA N, BUSTO MD, PEREZ MATEOS M (1998) *Bioresource Technol.* 64:105
- (5) EL-SAMALIGY M, ROHDEWALD P (1983) *Intern J Pharm* 13:23
- (6) SAHOO SK, TAPAS KD, GHOST PK, MAITRA A (1998) *J Colloid &Interface Sci* 206:361
- (7) BUM SL, OKANO T, KATAOKA K (1996) *J Pharm Sci* 85:85
- (8) PEKAREK KJ, JACOB JS, MATHLOWITZ E (1994) *Nature* 367:258
- (9) LANGER R, (1998) *Nature* 392:5
- (10) PONS R, RAVEY JC, SAUVAGE S, STÉBE SM, ERRA P, SOLANS C (1993) *Colloids & Surfaces A:Physicochem Eng Aspects* 76:171
- (11) PONS P, CARRERA I, ERRA P, KUNIEDA H, SOLANS C (1994) *Colloids & Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 91:259
- (12) RUCKENSTEIN E, PARK JS (1990) *Polymer* 31:2397.
- (13) KRIWET B, WALTER E, KISSEL T (1998) *J Controlled Release* 56:149.
- (14) BUM SL, OKANO T, KATAOKA K (1996) *J Pharm Sci* 85:85
- (15) TERREROS A (1999) Doctoral Thesis, University Complutense of Madrid (Chapter 6)