

————— *Artículo original* —————

Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida

JUAN PABLO HERVÁS-PÉREZ¹, MARTA SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ², ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS²,
BEATRIZ LÓPEZ-RUIZ^{1*}

¹*Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia*

²*Departamento de Química-Física II. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid*

RESUMEN

La galactosemia es uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes. Su presentación clínica en niños no tratados puede ser severa, a veces mortal; su diagnóstico es relativamente simple y su tratamiento es muy sencillo y efectivo. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan propuesto nuevos diseños de biosensores para la determinación de galactosa basados en galactosa oxidasa. El objetivo del trabajo consistió en la inmovilización de galactosa oxidasa (GLOx) en micropartículas de poliacrilamida (PAA), sintetizadas a partir del método de emulsión concentrada, y su utilización como material biológico de un nuevo biosensor amperométrico para la determinación de galactosa. Para preparar los biosensores de galactosa se depositaron las micropartículas con galactosa oxidasa sobre la superficie de un electrodo de platino y se cubrieron con una membrana de diálisis. Las micropartículas se caracterizaron mediante un analizador de partículas Galai Cis-1, microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría de barrido diferencial. La temperatura de transición vítrea (T_g) de los microgeles de poliacrilamida disminuyó al encapsular en su interior galactosa oxidasa. Se estudió

* **Información de contacto:** Beatriz López-Ruiz.

Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia.

Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid.

Teléfono: +34 913941756.

Fax: +34 913941751.

bealopru@farm.ucm.es

la influencia de distintos factores, tales como grado de reticulación, pH y temperatura en la respuesta del biosensor. Las condiciones óptimas se corresponden a un grado de reticulación del 7%, 40° C y pH 7,0. El sistema de inmovilización propuesto apenas modifica la actividad enzimática, pero parece proteger a la enzima aumentando el intervalo de temperatura en el que es activa.

Palabras clave: Emulsión concentrada.—Micropartículas.—Electrodo enzimático.—Galactosa oxidasa.

ABSTRACT

Amperometric biosensor based on polyacrylamide microgels for galactose determination

Galactosemia is one of the natural errors of the metabolism more frequent, its clinical representation in children not treated can be severe, sometimes mortal; its diagnostic is relatively simple and its treatment is very easy and effective. Hence, in last years new biosensors design for galactose determination based on galactose oxidase has been proposed. The aim of this work consists of the immobilization of galactose oxidase (GLOx) in polyacrylamide microparticles, using the concentrated emulsion method, and their use as biological material of a new amperometric biosensor for galactose determination. For preparing the galactose biosensors, microparticles with galactose oxidase were deposited on the surface of a platinum electrode and covered with a dialysis membrane. Microparticles were characterized by a Galai Cis-1 particle analyzer system, scanning electron microscopy, X-rays diffraction and differential scanning calorimetry. The presence of galactose oxidase decreases the transition temperature (Tg) of the polyacrylamide microgels. The influence of several experimental factors, such as crosslinking content, pH and temperature, on the biosensor response was investigated. The optimal performance of the biosensor takes place for a cross-linking of 7.0%, 40°C and pH 7.0. The proposed immobilization system almost does not modify the enzyme activity, but seems to protect to the enzyme because an increase of the temperature range in which the enzyme is active is observed.

Key words: Concentrated emulsion.—Microparticles.—Enzyme electrode.—Galactose oxidase.

INTRODUCCIÓN

Los biosensores amperométricos son dispositivos analíticos que presentan una gran aplicación en campos tales como la química clínica, la industria farmacéutica, la industria alimentaria, estudios medioambientales, etc. Su campo de aplicación está en expansión

gracias a algunas de sus propiedades como especificidad, selectividad, facilidad y rapidez de uso, intervalo de linealidad, posibilidad de miniaturización, bajo coste, etc. (1, 2, 3, 4). Los biosensores constan de un elemento biológico en íntimo contacto con un transductor responsable de la medida analítica. Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del material biológico empleado en el diseño de biosensores, se emplean distintos métodos de inmovilización, que proporcionan un medio en el que el biomaterial se encuentra protegido. Uno de los sistemas de inmovilización más utilizados consiste en la encapsulación del material biológico dentro de una matriz polimérica (5, 6). A modo de ejemplo, la glucosa oxidasa se ha inmovilizado, con éxito, en electropolímeros (7, 8), hidrogeles (9, 10) y más recientemente en látex (11). En cuanto a la galactosa oxidasa se ha inmovilizado en electropolímeros (12, 13, 14), en diferentes películas poliméricas (15, 16, 17) e hidrogeles (18, 19). Una de las principales aplicaciones de los biosensores compuestos por galactosa oxidasa es el estudio del nivel de galactosa en sangre, ya que este parámetro tiene una gran importancia en química clínica para el análisis preventivo de la galactosemia, patología metabólica en los recién nacidos. La galactosemia es una enfermedad en la cual la ausencia de la enzima galactosa fosfatouridil transferasa produce la incapacidad de utilizar el azúcar simple galactosa, que compone la mitad de la lactosa, el azúcar que se encuentra en la leche, esto provoca una acumulación de galactosa dentro del organismo, y como consecuencia la aparición de lesiones en el hígado y en el sistema nervioso central.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Acrilamida, NN'-metilen-bis-acrilamida, galactosa y galactosa oxidasa (GLOx) (E.C.1.1.3.9) de *Dactylium dendroxides* con una actividad de 14UI/mg de sólido fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El persulfato de amonio (PSA), Span 80, NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED) y dodecano por Fluka (Buchs, Switzerland). La membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) comprendido entre 12.000 y 14.000 daltons por

Spectrum Medical Industries. Todos los reactivos fueron usados tal y como se recibieron. El agua utilizada fue de calidad Milli Q (Millipore, Milford, MA, USA).

Aparatos

Para el estudio morfológico de las micropartículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido JOEL, modelo JSM-6400, que opera a 20KV y una magnificación de 5000. Con el analizador Galai Cis-1 se realizó el estudio del tamaño de las partículas. Los difractogramas se obtuvieron con un difractor Philips X'Pert modelo PW3050. Las medidas de calorimetría se llevaron a cabo con un calorímetro diferencial programado Mettler modelo 820. Para las medidas amperométricas se utilizó un potenciómetro Metrohm modelo E-506 (Herisau, Switzerland), con una celda electroquímica termostatazada compuesta por tres electrodos; un electrodo de referencia (electrodo de calomelanos saturado), un electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo de platino.

Síntesis de microgeles

La preparación de las micropartículas con galactosa oxidasa se realizó mediante el método de polimerización desde emulsión concentrada (20), siendo la fracción máxima de volumen $\Phi = 0,86$. Para estabilizar la emulsión W/O se utilizó el tensoactivo Span 80 (monooleato de sorbitol), con un coeficiente hidrofilia-lipofilia (HLB) de 4,3. El Span 80, junto con el dodecano, forma la fase oleosa. La fase acuosa está formada por una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M, pH 6,0, el monómero (acrilamida), el agente reticulante (NN'-metilen-bis-acrilamida) y el agente iniciador (PSA). Con el fin de eliminar el O₂ disuelto se pasó una corriente de N₂, tanto por la fase acuosa como por la fase oleosa. La formación de la emulsión concentrada se llevó a cabo mediante la inyección de la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa. Este proceso se realizó bajo agitación magnética constante, obteniéndose finalmente una emulsión con aspecto lechoso. Una vez obtenida la emulsión se procedió a la polimerización, proceso que fue acelerado mediante la adición

de TEMED. El sistema se mantuvo bajo agitación continua durante 60 minutos, tiempo adecuado para completar la reacción de polimerización. Se procedió a la extracción de las micropartículas utilizando en primer lugar una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M frío, pH 6,0. El precipitado obtenido se lavó con acetona, y se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos, obteniéndose un producto sólido, que se liofilizó durante 24 horas. Las micropartículas así obtenidas se conservaron a -4° C.

TABLA 1. *Composición detallada de las fases acuosa y oleosa de la emulsión precursora*

	$\eta = 6\%$	$\eta = 6,5\%$	$\eta = 7\%$	$\eta = 7,5\%$	$\eta = 8\%$
FASE EXTERNA (oleosa)					
Dodecano	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l
Span 80	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
FASE INTERNA (acuosa)					
Acrilamida	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg
Bisacrilamida	45 mg	48,75 mg	52,5 mg	56,25 mg	60 mg
Disolución tampón pH 7,0	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
PSA	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg
Enzima GlOx (14 UI/mg)	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

El tamaño de poro de la matriz polimérica reticulada obtenida está determinado por la relación entre la cantidad de agente reticulante y la de monómero. La fracción de agente reticulante (grado de reticulación) en tanto por ciento viene dada por la expresión:

$$\eta = \frac{AR(g)}{AR(g) + M(g)} \times 100$$

donde AR es la cantidad de agente reticulante y M la cantidad de monómero expresadas ambas en gramos.

En la Tabla 1 se muestra la composición de las fases precursoras de la emulsión de poliacrilamida utilizada en la encapsulación de GLOx para cada grado de reticulación.

Preparación del biosensor amperométrico

El biosensor propuesto consta de dos partes: el transductor, formado por un electrodo de platino y el componente biológico, GLOx inmovilizada en el interior de las micropartículas de poliacrilamida. Una cantidad exactamente pesada (3 mg) de estas micropartículas se pone en contacto con la superficie electródica, formando así una película uniforme alrededor de la misma. Mediante una membrana de diálisis de MWCO 12.000-14.000 D, las micropartículas se retienen en la superficie del electrodo de platino de forma que se permite el paso de la galactosa a través de sus poros. Un esquema de dicho biosensor se muestra en la Figura 1.

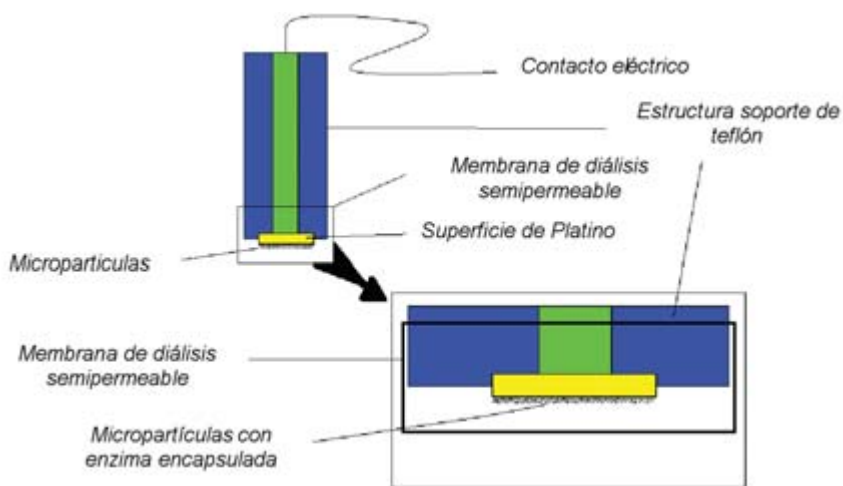


FIGURA 1. *Diseño del sensor amperométrico.*

RESULTADOS

Caracterización de las micropartículas con microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2 se muestra la micrografía de micropartículas de poliacrilamida de grado de reticulación 7%, con GLOx en su interior.

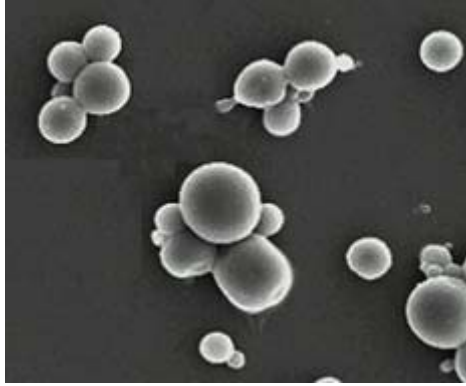


FIGURA 2. *Micrografía de micropartículas de poliacrilamida con GLOx, $\eta = 7\%$.*

Caracterización de las micropartículas con GALAI CIS-1

El estudio de tamaño de las micropartículas en agua se realizó mediante un analizador de tamaños Galai Cis-1. En la Figura 3 se representa la distribución de tamaños obtenida.

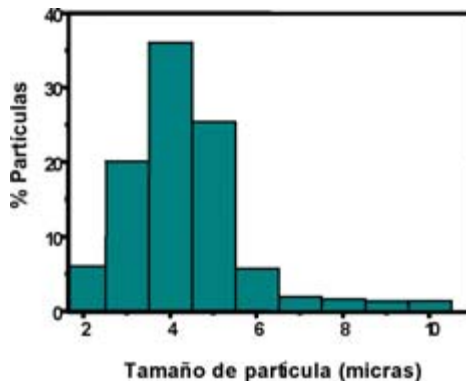


FIGURA 3. *Distribución de tamaños de las micropartículas en agua.*

Estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g), del microgel

Además del tamaño de poro, otras propiedades del polímero, como la temperatura de transición vítrea (T_g), también se ven modificadas con la concentración de agente reticulante (20).

Este estudio se realizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). Para ello se tomaron micropartículas liofilizadas y se calentaron a 120°C durante 10 minutos. El contenido de agente entrecruzante de las micropartículas estudiadas varió entre 6% y 8%, próximo al valor óptimo para la inmovilización del enzima. La Figura 4a muestra el termograma obtenido con 4 mg de micropartículas de poliacrilamida (PAAm) con GlOx de $\eta = 7\%$, al someterlas a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. En la Figura 4b se observa la relación entre T_g y el contenido de entrecruzante.

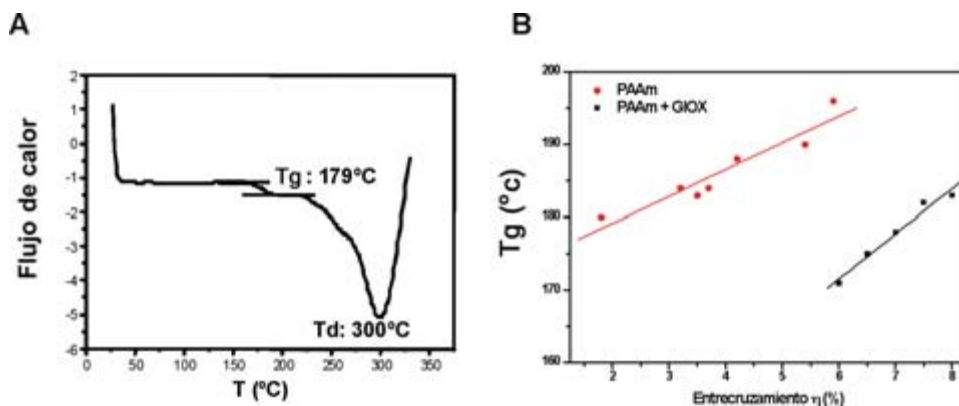


FIGURA 4. (A) Termograma obtenido con micropartículas de poliacrilamida con GlOx $\eta = 7\%$. Velocidad de calentamiento $10^\circ\text{C}/\text{min}$., peso muestra 4 mg. (B) Efecto del grado de reticulación en la temperatura de transición vítrea del microgel con y sin GlOx.

Difracción de rayos X

En la Figura 5 se muestra el difractograma obtenido con micropartículas de GlOx de $\eta = 7\%$. El espaciado d , correspondiente a estas reflexiones, se ha calculado utilizando la fórmula de Bragg.

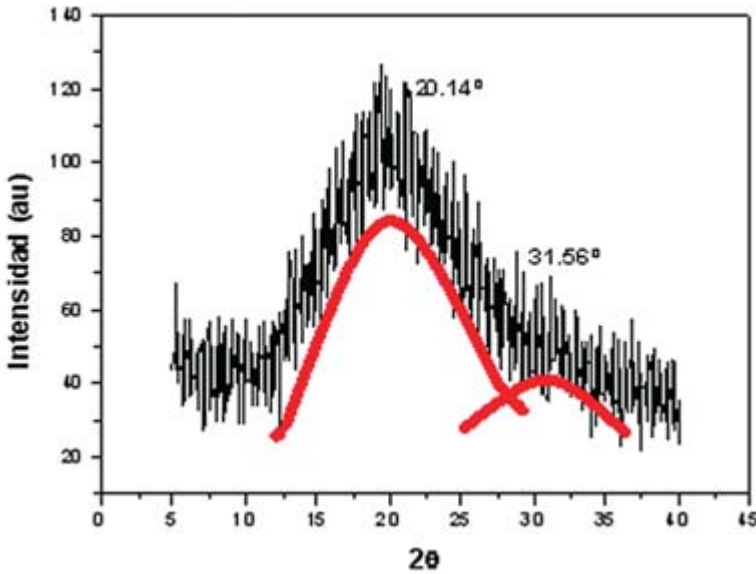
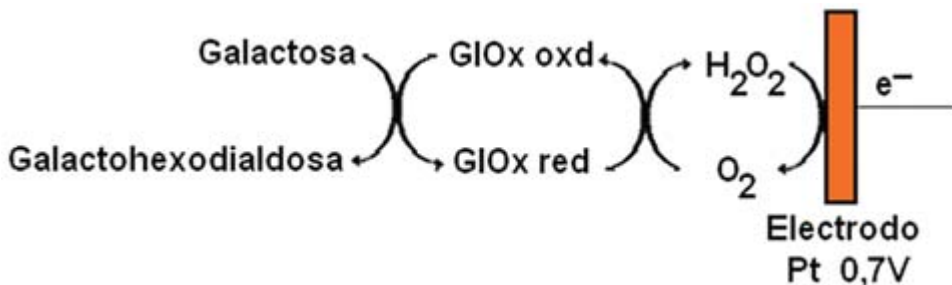


FIGURA 5. *Difractograma correspondiente a micropartículas de PAA con GIOx, $\eta = 7\%$.*

Diseño de un biosensor para la determinación de galactosa

Como se muestra en el siguiente esquema, al reaccionar la galactosa con la galactosa oxidasa se genera peróxido de hidrógeno que se oxida en el electrodo a un potencial de +0,7 V vs ECS, dando lugar a una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de galactosa en la disolución. En la Figura 6 se muestra el incremento y perfil de corriente producido al añadir galactosa a la disolución de tampón fosfato.



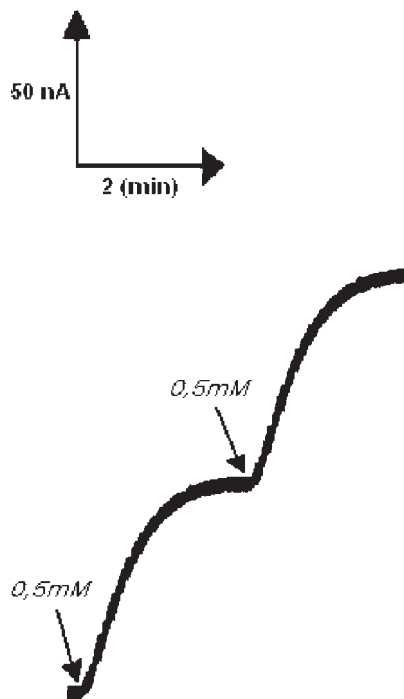


FIGURA 6. *Respuesta del biosensor a una concentración de galactosa 0,5 mM.*

Influencia del grado de reticulación de las micropartículas poliméricas

Para realizar este estudio se utilizaron micropartículas con distintos grados de reticulación (6; 6,5; 7; 7,5 y 8%). Se prepararon cinco biosensores con las diferentes micropartículas tomando en cada caso 3 mg de micropartículas. Se examinó la respuesta de estos biosensores en función de la concentración de galactosa añadida hasta llegar a la concentración de galactosa correspondiente a la saturación enzimática. Las adiciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato sódico 0,1M pH 6,0 y las medidas se llevaron a cabo a 25° C y + 0,7 V vs. ECS. En la Figura 7 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con biosensores fabricados por micropartículas de distintos grados de reticulación. En la Tabla 2 se muestran las propiedades analíticas de dichos biosensores.

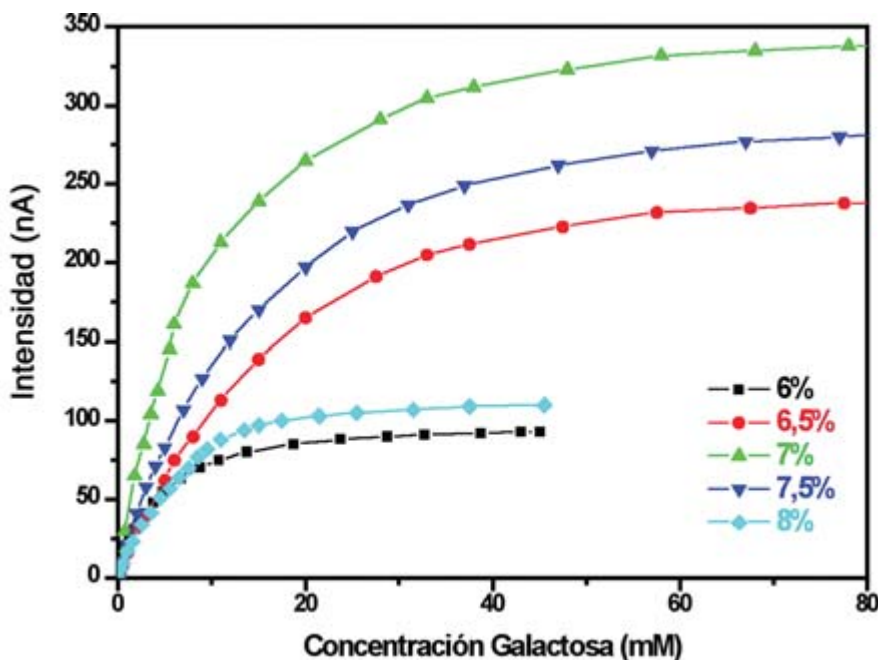


FIGURA 7. *Curvas de calibrado de los biosensores de galactosa para los distintos grados de reticulación. Condiciones experimentales: pH 6,0, 25° C y +0,7 V vs. ECS.*

Para comprobar si la reacción global del biosensor obedece a una cinética del tipo Michaelis-Menten se calculó el índice de Hill (n) a partir de la ecuación de Hill (21):

$$\log \left[\left(\frac{i_{m\acute{a}x}}{i} \right) - 1 \right] = \log Km_{app} - n \log [S] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde n es el grado de desviación de la reacción del biosensor de la cinética de Michaelis-Menten, de modo que cuanto más se desvíe dicho parámetro de la unidad menos se ajustará la cinética de la reacción global a una cinética de Michaelis-Menten.

En la Tabla 3 se recogen los valores del índice de Hill obtenidos para los distintos grados de reticulación.

TABLA 2. *Propiedades analíticas de los biosensores preparados con microgeles de distintos grados de reticulación*

η (%)	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μ A cm ⁻²)	Rango lineal (M)	r (n)	Límite de detección (M)
6,0	0,12	1,33	1,0 10 ⁻³ - 5,0 10 ⁻³	0,9914 (6)	5 10 ⁻⁴
6,5	0,16	3,29	1,0 10 ⁻³ - 6,0 10 ⁻³	0,9940 (5)	5 10 ⁻⁴
7,0	0,30	4,83	7,5 10 ⁻⁴ - 8,0 10 ⁻³	0,9955 (8)	9 10 ⁻⁴
7,5	0,17	4,09	2,0 10 ⁻³ - 9,0 10 ⁻³	0,9936 (6)	4 10 ⁻⁴
8,0	0,10	1,57	2,5 10 ⁻³ - 8,5 10 ⁻³	0,9960 (7)	5 10 ⁻⁴

TABLA 3. *Parámetros cinéticos de los biosensores formados por microgeles con distintos entrecruzamientos*

η (%)	Coefficiente de Hill	Km _{app} (mM)
6,0	1,03	7,03
6,5	1,04	6,96
7,0	1,05	4,82
7,5	1,14	5,31
8,0	1,20	5,61

El cálculo de la Km se realizó a partir de las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk (22), utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario para sucesivas adiciones de sustrato hasta no obtener variación apreciable de la intensidad de corriente.

Influencia del pH

Este estudio se realizó con una disolución tampón acetato/fosfato de sodio 0,1M para el intervalo de pHs comprendido entre 4,0 y 8,0.

Respecto a las demás condiciones experimentales, se tomaron 3 mg de micropartículas con grado de reticulación $\eta = 7\%$, realizándose las medidas a 25°C y a $+0,7\text{ V vs. ECS}$. En la Figura 8 se muestra la variación de la respuesta máxima relativa en función del pH.

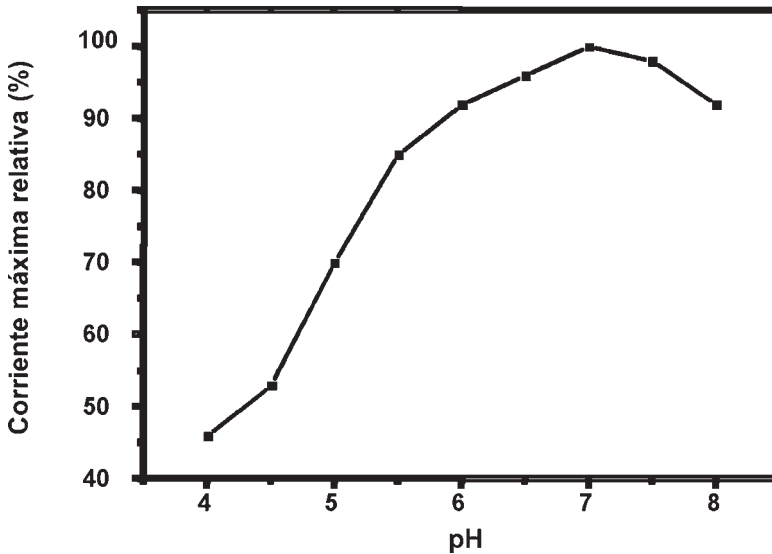
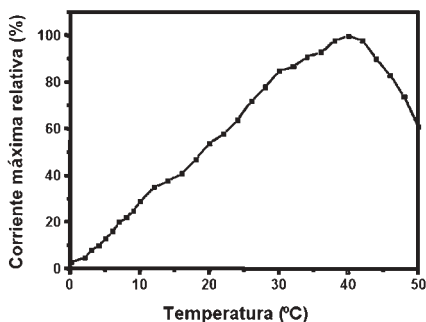


FIGURA 8. *Efecto del pH en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales: 0,1M galactosa, 25°C y $+0,7\text{ V vs. ECS}$.*

Influencia de la temperatura

El estudio de la temperatura se realizó utilizando una celda electroquímica termostatazada. Para la preparación del biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas de grado de reticulación $\eta = 7\%$; las adiciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7, y las medidas se hicieron a un potencial de $+0,7\text{V vs. ECS}$ (Figura 9a). En la Figura 9b se muestra la curva de Arrhenius.

A



B

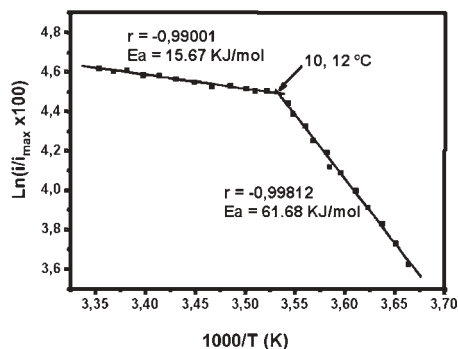


FIGURA 9. (A) Efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor. (B) Curva de Arrhenius del biosensor elaborado con microgeles de $\eta = 7\%$. Condiciones experimentales: 0,1 M galactosa, pH 7 y + 0,7 V vs. ECS.

DISCUSIÓN

El estudio se inició con la caracterización de los microgeles usados como sistema de inmovilización de la GLOx, con el objetivo de investigar el efecto de incluir el enzima en el interior de una matriz polimérica en la estructura de dicha matriz.

Las micropartículas presentan forma esférica y gran polidispersidad, el 80% de ellas muestran un tamaño comprendido entre 3 y 5 micras.

La transición vítrea aparece en los polímeros amorfos y existe el criterio de que cualquier factor que dificulte la movilidad molecular de la cadena polimérica tiende a incrementar la Tg. Por ejemplo, el aumento de las fuerzas intermoleculares y del peso molecular del polímero, la rigidez y tamaño de las ramas y grupos laterales y también el aumento del grado de entrecruzamiento son factores que hacen que la Tg aumente.

En la Figura 4a se pueden ver con claridad dos procesos térmicos entre 20° C y 350° C. Primero se observa un salto en la capacidad calorífica a 179° C correspondiente a la transición vítrea del polímero seguido por un pico endotérmico alrededor de 300° C que se asocia con la descomposición del microgel.

Como era de esperar, se observa una dependencia lineal de la Tg con el grado de reticulación, ya que, aunque esta relación depende de varios factores como el número de moléculas entrecruzantes por gramo de monómero y el peso molecular del polímero (23), para contenidos de agente entrecruzante no muy grandes se puede aproximar a una relación lineal (24).

La Tg aumenta de forma lineal al aumentar el contenido de agente reticulante en el intervalo estudiado (Figura 4b) tanto en los microgeles vacíos como en los que contienen GLOx. Este cambio se puede describir por las siguientes expresiones:

$$\text{Micropartículas vacías: } T (\text{°C}) = 171,9 + 3,9 \eta (\%)$$

$$\text{Micropartículas con GLOx: } T (\text{°C}) = 169,9 + 6,9 \eta (\%)$$

Asimismo en la Figura 4b se observa como la Tg de las micropartículas de poliacrilamida sin enzima con distintos grados de reticulación (20) es siempre mayor que para aquellas micropartículas que poseen en su interior la enzima GLOx inmovilizada, al igual que ocurría con las micropartículas de PAA con glucosa oxidasa (20), aunque en este caso (GOx) el descenso observado en la Tg fue mayor, probablemente debido al mayor tamaño de la enzima.

Referente al estudio de las micropartículas mediante difracción de rayos X, se observan dos máximos anchos que son característicos de estructuras amorfas y que aparecen en este caso centrados alrededor de las posiciones $2\theta_1 = 20,14$ grados y $2\theta_2 = 31,56$ grados. Los valores medios de los espaciados obtenidos fueron $d_1 = 4,6$ Å y $d_2 = 2,98$ Å. No se observa ningún cambio de los espaciados al variar el contenido de agente entrecruzante, sólo pequeñas fluctuaciones que se atribuyen a las heterogeneidades que se forman dentro de los microgeles durante el proceso de polimerización, que son difíciles de reproducir. Glans y Turner (25) encontraron un valor de espaciado, en microgeles de PAA, de $4,15$ Å y observaron un aumento de este valor hasta $4,42$ Å al calentar el microgel. Por tanto, este espaciado d_1 parece corresponder con la distancia entre cadenas poliméricas. Por el contrario, el espaciado d_2 no se observa en microgeles sin enzima, por lo que pensamos debe estar relacionado con la presencia de galactosa oxidasa dentro del microgel y se corresponde con alguna característica estructural de la enzima.

El grado de reticulación permite establecer el valor óptimo al cual la enzima queda retenida sin que se vea afectada la difusión del sustrato (galactosa) hacia el interior de la micropartícula, permitiendo la reacción enzimática. La máxima respuesta se alcanza con 7%, este grado de reticulación da lugar a micropartículas en las que toda la enzima se retiene, hipótesis que se corroboró al no observar actividad enzimática en el líquido sobrenadante de lavado. Grados de reticulación menores dieron lugar a menores corrientes. Este resultado se explicaría si consideramos que cuando el grado de reticulación fue 6,5%, el microgel formado presenta un poro lo suficientemente grande como para que la enzima pueda atravesarlo, interpretación que quedó confirmada con la aparición de actividad enzimática en el líquido sobrenadante. Aún es mayor la pérdida para un grado de reticulación $\eta = 6\%$, y así se observa en la Figura 8, con un descenso apreciable en la corriente máxima. Cuando los valores son mayores que el óptimo, el descenso de la intensidad medida por el biosensor no se debería a una pérdida de enzima, sino a que la matriz generada es tan densa y el tamaño de poro es tan pequeño que además de ralentizar el acceso del sustrato a la micropartícula podría dificultar el contacto entre el sustrato y los centros activos del enzima. De acuerdo con estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron con micropartículas de grado de reticulación 7%.

Como puede verse en la Tabla 3, los valores de índice de Hill obtenidos están muy próximos a la unidad para grados de reticulación de 6%, 6,5% y 7%, lo que nos indican que, en estos casos, la reacción global del biosensor se ajusta bastante a la cinética enzimática de Michaelis-Menten, y parece indicar que es la reacción enzimática la limitante frente a la difusión del sustrato a la superficie enzimática a través del microgel. En los casos en los que el valor de índice de Hill es significativamente superior a 1 (para grados de entrecruzamiento 7,5% y 8%) la etapa limitante de la reacción global del biosensor parece ser la difusión del sustrato, como era de esperar, ya que para esos grados de reticulación la matriz polimérica es tan densa que dificulta el movimiento del mismo.

Al estudiar el efecto del pH en la corriente generada en el biosensor se obtuvo la máxima respuesta a pH 7,0. Este valor de pH observado al inmovilizar la GlOx en micropartículas de poli(acrilamida

coincide con el observado en otros sistemas de inmovilización enzimática propuestos por distintos autores (16, 26, 27).

Como muestra la Figura 9a, la máxima actividad enzimática se produce a una temperatura de 40° C y el intervalo donde la respuesta relativa es superior al 90% se sitúa entre 32 y 42° C. A partir de 42° C la actividad enzimática relativa disminuye, debido a que la GLOx comienza a desnaturalizarse. Según los valores encontrados en la literatura, Tressel et Kosman (28) encontraron la máxima actividad de la GLOx en disolución a 25° C, mientras que Gülce y colaboradores la sitúan en 35° C, disminuyendo cuando la temperatura supera 40° C (14). Según nuestros resultados, la desnaturalización de la enzima inmovilizada comienza a 40° C, temperatura superior a la que presenta esta enzima en disolución, lo que indica un efecto protector de la matriz del polímero en la actividad de la enzima.

En la curva de Arrhenius se observan dos tramos lineales. Las energías de activación (E_a) obtenidas a partir de las pendientes de dichas rectas fueron 15,7 KJ/mol y 61,9 KJ/mol. Las rectas se cortan a una temperatura de 10,12° C. Según las curvas de Arrhenius obtenidas con esta misma matriz polimérica al encapsular la enzima glucosa oxidasa y tirosinasa (29, 30), el cambio en la energía de activación observado a 10,12° C parece estar relacionado no tanto con cambios conformacionales del enzima con la temperatura, como aseguran algunos autores (31), sino a un cambio en el entorno del enzima y en concreto a cambios en el medio polimérico. La temperatura de cambio parece tener relación con la transición de volumen del polímero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de este trabajo a través del proyecto MAT2003-03051-C0303. Agradecer también a A. Rodríguez (Centro de Microscopía Electrónica, UCM) y Ester Gil Alegre (Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica) por su apoyo técnico y profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KULAGINA, N. V.; SHANKAR, L., MICHAEL, A. C. (1999): Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors. *Anal. Chem.* 15: 5093-5100.
- (2) GUERRIERI, A., PALMISANO, F. (2001): An Acetylcholinesterase/Choline Oxidase-Based Amperometric Biosensor as a Liquid Chromatography Detector for Acetylcholine and Choline Determination in Brain Tissue Homogenates. *Anal. Chem.* 73: 2875-2882.
- (3) CRESPI, F. (2002): *In vivo* voltammetry and concomitant electrophysiology at a single micro-biosensor to analyse ischaemia, depression and drug dependence. *J. Neur. Met.*, 119: 173-184.
- (4) MOSER, I.; JOBST, G., URBAN, G. A. (2002): Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine. *Biosens. Bioelectron.* 17: 297-302.
- (5) BENAS, B.; BENOIT, M. A., POULINE, O. (2000): Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine.* 18: 1495-1505.
- (6) HILDEBRAND, G. E., TACK, J. W. (2000): Microencapsulation of peptides and proteins. *I. J. Pharm.* 196: 173-176.
- (7) COSNIER, S. (1999): Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. *Biosens. Bioelectron.* 14: 443-456.
- (8) ADELOJU, S. B., MOLINE, A. N. (2001): Fabrication of ultra-thin polypyrrole-glucose oxidase film from supporting electrolyte-free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. *Biosens. Bioelectron.* 16: 133-139.
- (9) BLANDINO, A.; MACIAS, M., CANTERO, D. (2001): Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules *Proc. Biochem.* 36: 601-606.
- (10) CALVO, E. J.; ETCHENIQUE, R.; PIETRASANTA, L.; WOLOSUK, A. DANILOWICZ, C. (2001): Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)(2)CIP y CH₂NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Anal. Chem.* 73: 1161-1168.
- (11) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PEREZ, E., RICO-LATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.
- (12) MANOWITZ, P.; STOECKER, P. W., YACYNICH, A. M. (1995): Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosens. Bioelectron.* 10: 359-370
- (13) COCHE-GUERENTE, L.; COSNIER, S.; INNOCENT, C., MAILLEY, P. (1995): Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 311: 23-30.
- (14) GÜLCE, H.; ATAMAN, I.; GÜLCE, A., YILDIZ, A. (2002): A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enz. and Microb. Tech.* 30: 41-44.
- (15) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosens. Bioelectron.* 20: 651-657.

- (16) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk. *Electrochim. Acta.* 49: 2479-2485.
- (17) EKINCI, E., PAŞAHAN, A. (2004): Poly (4-methoxyphenol) film as a galactose-sensing material. *Eur. Pol. J.* 40: 1605-1608.
- (18) YANG, Y.; MU, S., CHEN, H. (1998): Electrochemical synthesis of polypyrrole for the immobilization of galactose oxidase. *Synth. Metals.* 92: 173-178.
- (19) BRAHIM, S.; NARINESINGH, D., GUISEPPI-ELI, A. (2002): Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* 17: 53-59.
- (20) RUBIO, RETAMA, B. J.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J., LÓPEZ-RUIZ, B. (2003): Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. *Biomaterials.* 24: 2965-2973.
- (21) IWUOHA, E. I.; ADEYOJU, O.; DEMPSEY, E., SMUTH, M. R. (1995): Investigation of the effects of polar organic solvents on the activity of tyrosinase entrapped in a poly(ester-sulphonic acid) polymer. *Biosens. Bioelectron.* 10: 661-667.
- (22) DIXON, M., WEBB, E. C. (1979): *Enzymes.* 3rd edition, p. 92-93. Academic Press. New York.
- (23) GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; FERNÁNDEZ-TORROBA, M. A., PIZARRO, C. (1999): Study by response surface methodology of the swelling kinetic of weakly basic polyacrylamide gels in water. *Eur. Pol. J.* 35: 509-516.
- (24) DIMARZIO, E. A. (1964): Nature of the glass transition and the glassy state. *J. Res. Natl. Bur. Stds.* 68A: 611.
- (25) GLANS, J. H., TURNER, D. T. (1981): Glass transition elevation of polystyrene by crosslinks. *Polymer.* 22: 1540-1543.
- (26) SZABÓ, E. E.; ADÁNYI, N.; VÁRADI, M. (1996): Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* 11: 1051-1058.
- (27) TRÁČ, J.; NAVRÁTIL, M.; ŠTURDÍK, E., GEMEINER, P. (2001): Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enz. and Microb. Tech.* 28: 383-388.
- (28) TRESSEL, P. S., KOSMAN, D. J. (1982): Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Meth. Enzymol.* 89: 163-171.
- (29) RUBIO RETAMA, B. J.; LÓPEZ-RUIZ, B.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J. (2005): High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. *Talanta.* 68: 99-107.
- (30) HERVÁS PÉREZ, J. P.; SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; LÓPEZ-CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. (2006): Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosens. Bioelectron.* 22: 429-439.
- (31) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PÉREZ, E.; RICO-LATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.