

Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay"

INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE GLUCOSA OXIDASA Y PEROXIDASA

Yuria Bilbao Abraham,¹ Lilliam Valdés Diez² y Yasmín T. Blanco López³

RESUMEN

Las enzimas por su función catalítica tienen amplia aplicación en infinidad de procesos tecnológicos y en los últimos 15 años han marcado avances significativos en la industria. Dentro de la Industria Farmacéutica y Biológica, la dedicada a los medios diagnósticos ha recibido también el impacto de la introducción de este tipo de productos, soportando en la actualidad tecnologías tan importantes como el inmunoensayo enzimático, el diagnóstico en química clínica y la química seca, donde las técnicas de inmovilización alcanzan un desarrollo cada vez mayor por el incremento de la estabilidad que se logra con estos sistemas. Se presentan ensayos de inmovilización covalente de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa sobre papel de filtro Whatman No. 2. Fueron ensayadas 2 variantes: la inmovilización covalente de un polímero soluble de las enzimas y la inmovilización covalente de una solución de las enzimas libres. Los resultados del proceso se evaluaron frente a soluciones de referencia de glucosa en concentraciones entre 2,0 y 55,0 mmol/L. Las mejores respuestas se encontraron con el más bajo porcentaje de inmovilización en el caso del enlazamiento del polímero, y para la solución de las enzimas libres correspondió al más alto grado de inmovilización logrado.

Descriptor DeCS: ENZIMAS INMOVILIZADAS/ metabolismo; GLUCOSA OXIDASA/ metabolismo; PEROXIDASAS/ metabolismo.

En los últimos años, el campo de los medios diagnósticos se ha visto cada vez más impactado por los avances biotecnológicos; creándose diversos sistemas en los que intervienen las enzimas como analitos o reactivos.

Cuando estas enzimas tienen la función de reactivos, pueden aparecer en numerosas formas y se emplean procesos tecnológicos diversos en la preparación de éstas.

En la bioquímica clínica, las enzimas inmovilizadas han alcanzado un desarrollo

¹ Ingeniera Química. Investigadora Agregada.

² Master en Ciencias en Bioquímica de las Proteínas. Investigadora Titular.

³ Licenciada en Bioquímica. Centro Nacional de Ensayos Clínicos.

considerable por el incremento de la estabilidad que se logra con estos sistemas y se han aplicado en diversos métodos de diagnóstico, como los biosensores¹ y la inmunocromatografía. En química seca ya aparecen introducidas las tiras reactivas para la cuantificación de importantes parámetros en la consulta del médico y su extensión al autocontrol de los propios pacientes.

La determinación de los niveles de glucosa tanto en sangre como en orina, resulta de gran interés para el diagnóstico, control y seguimiento de los pacientes diabéticos. La introducción de las tiras reactivas para este diagnóstico ha tenido un gran impacto por los beneficios que se logran en el manejo de esta afección.

Se encuentran numerosas tecnologías para la elaboración de este diagnosticador; las enzimas GOD y POD aparecen inmovilizadas por absorción o polimerizadas, y se emplean diversos cromógenos y agentes estabilizantes. Estos sistemas han sido desarrollados para realizar determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas en sangre y en orina.^{2,3}

Aparecen también diversas metodologías para la inmovilización de la GOD, como las que emplean albúmina bovina y glutaraldehído en el entrecruzamiento de la enzima con el soporte^{4,5} y las que la enzima es enlazada covalentemente a membranas de diferentes naturalezas.⁶

Nuestra labor ha estado encaminada a lograr la inmovilización covalente de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa sobre papel de celulosa, con el objetivo de obtener una tecnología que permita su aplicación en la producción de diagnosticadores.

MÉTODOS

La inmovilización de las enzimas por enlace covalente se realizó sobre papel de

filtro Whatman No. 2 previamente activado con peryodato de sodio. Se ensayaron concentraciones de 0,05; 0,10; 0,15 y 0,20 mol/L del agente activador (NaIO₄).

El proceso se realizó durante 1 h en la oscuridad y con agitación. Se emplearon 10 mL de las soluciones activadoras para un área de papel de 7 × 7 cm.

Se realizaron 6 lavados con agua destilada al soporte, en los que se emplearon igual volumen que el de la solución activadora.

Se evaluó la concentración de peryodato de sodio en la solución activadora residual y en el agua de los lavados. El grado de oxidación del papel se calculó según la expresión siguiente:

$$GO = (\text{mg NaIO}_4 \text{ inicial} - \text{mg NaIO}_4 \text{ residual} + \text{lavados}) / \text{área de soporte}$$

La concentración de peryodato de sodio se determinó con yoduro de potasio en presencia de bicarbonato de sodio.⁷

Se realizaron 2 ensayos de inmovilización: la inmovilización covalente de un polímero soluble de glucosa oxidasa y peroxidasa obtenido con la utilización de glutaraldehído como agente bifuncional y albúmina bovina como proteína protectora,³ y la inmovilización covalente de las enzimas libres en *buffer* borato 0,10 mol/L y albúmina al 1 %.

En los 2 ensayos la inmovilización se realizó durante 16 h a 4 °C, con agitación y 10 mL de la solución de inmovilización. Se añadió una cantidad de borohidruro de sodio igual a los miligramos totales de proteínas empleados en cada proceso y se colocaron en baño de hielo durante 30 min.

Por último se realizaron 3 lavados con 10 mL de *buffer* citrato 0,4 mol/L, pH 5,6 a cada soporte.

Se determinó la concentración de proteínas en las soluciones de inmo-

vilización iniciales, las soluciones residuales y el agua de los lavados mediante la lectura de absorbancia a 280 nm; se utilizó como coeficiente de extinción la unidad, por tratarse de una mezcla de proteínas.

El grado de inmovilización en cada soporte se calculó según las expresiones siguientes:

$$\text{mg proteínas} = \text{mg proteína inicial} - \text{mg proteína (residual + lavados) inmovilizadas}$$

$$\% \text{ Inmovilización} = (\text{mg proteína inmovilizada} / \text{mg proteína inicial}) \times 100.$$

Los soportes se secaron a 40 °C durante 1 h y fueron embebidos en una solución indicadora con o-tolidina para poder evaluar la eficiencia del proceso frente a soluciones de referencia de glucosa de 2,7; 5,87; 16,85 y 55 mmol/L.

Se empleó un espectrofotómetro Pye Unicam 8740 y los valores de pH fueron

medidos en un analizador de iones Corning modelo 255.

Se utilizó la GOD de *Aspergillus niger* de actividad específica mayor que 90 U/mg y POD de rábano picante producida por la firma BDH de RZ = 3 y actividad específica mayor que 80 U/mg.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

La tabla 1 presenta los valores del grado de oxidación logrado para cada concentración de peryodato de sodio utilizada y el correspondiente porcentaje de inmovilización en el enlazamiento covalente del polímero de GOD y POD. En la tabla 2 se muestra similar información para la inmovilización de las enzimas libres. En los 2 casos se relaciona también la respuesta obtenida frente a soluciones de referencia de glucosa.

TABLA 1. *Inmovilización covalente del polímero de GOD y POD*

Conc. NaIO ₄	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Respuesta
	GO	Porcentaje de inmovilización	GO	Porcentaje de inmovilización	GO	Porcentaje de inmovilización	
0,05 mmol/L	2,4	24,1	2,7	24,1	2,2	26,4	Muy buena
0,10 mmol/L	2,6	34,6	2,3	36,9	2,1	33,0	Buena
0,15 mmol/L	2,7	41,0	2,8	39,1	3,0	38,5	Mala
0,20 mmol/L	4,9	36,1	5,2	38,8	5,0	35,0	Mala

Respuesta obtenida: Muy buena: cambio cromático inmediato y diferenciable al minuto de reacción. Buena: el cambio cromático comienza a los 15 s, diferenciable al minuto de reacción. Débil intensidad del cambio. Mala: respuesta muy lenta y no uniforme.

TABLA 2. *Inmovilización covalente de las enzimas libres*

Conc. NaIO ₄	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Respuesta
	GO	Porcentaje de inmovilización	GO	Porcentaje de inmovilización	GO	Porcentaje de inmovilización	
0,05 mmol/L	2,4	33,7	2,7	40,3	2,2	31,0	Mala
0,10 mmol/L	2,6	34,1	2,3	37,4	2,1	36,3	Mala
0,15 mmol/L	2,7	36,9	2,8	38,7	3,0	33,5	Regular
0,20 mmol/L	4,9	39,8	5,2	41,0	5,0	43,2	Muy buena

Respuesta obtenida: Muy buena: cambio cromático inmediato. Al minuto de reacción se diferencian las concentraciones. Regular: cambio cromático a partir de los 30 s para las concentraciones 2,70; 5,87 y 16,85 mmol/L, e inmediato para 55,0 mmol/L. Buena diferenciación de concentraciones a los 2 min de reacción. Mala: el cambio cromático comienza a los 40 s, respuesta lenta.

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos importantes para lograr una inmovilización covalente exitosa es la activación del soporte; en nuestro caso la oxidación de los grupos hidroxilo del papel se logró con peryodato de sodio.

En el enlazamiento del polímero, para las 3 primeras concentraciones de peryodato de sodio (0,05; 0,10 y 0,15 mol/L), los grados de oxidación obtenidos fueron similares: 2,4; 2,3 y 2,8 mg/cm², pero los porcentajes de inmovilización aumentaron proporcionalmente a la concentración del agente activador (25; 34,8 y 39,5 %). Al activar el papel con peryodato de sodio 0,20 mol/L se obtuvo un grado de oxidación significativamente mayor (5,0 mg/cm²) y el porcentaje de inmovilización fue de 26,6. La disminución de éste se debe a la aparición de un impedimento estérico provocado por la presencia de mayor cantidad de polímero en el soporte, en correspondencia con el mayor número de grupos activados para el enlace del polímero a la matriz.

La mejor respuesta se logró con el porcentaje de inmovilización más bajo; el cambio cromático comenzó inmediatamente, intensificándose al transcurrir el tiempo y al minuto de reacción se obtuvo un cambio perfectamente diferenciable entre las diferentes concentraciones de glucosa.

En la medida que aumentó el porcentaje de inmovilización, la reacción transcurrió más lentamente, la aparición del cambio de color se retardó y con 39,5 % de inmovilización se obtuvo solamente un cambio muy ligero con la solución de 55 mmol/L de glucosa.

La respuesta obtenida se corresponde con los resultados del grado de oxidación y del porcentaje de inmovilización, ya que

en la medida que éstos aumentan, un mayor número de grupos en las enzimas están comprometidos en el enlace, lo que limita la actividad de éstas.

Con respecto a la inmovilización de las enzimas libres sucedió exactamente lo contrario. La mejor respuesta se obtuvo en el papel activado con la solución de peryodato de sodio 0,20 mol/L, con el 41,3 % de inmovilización.

En esta experiencia las enzimas fueron disueltas en el *buffer* sin existir una inmovilización previa, por lo que menos grupos están comprometidos en el enlace, lo que hizo la reacción más rápida y el cambio cromático mucho más claro para las diferentes concentraciones de glucosa.

En los soportes activados con 0,05 y 0,10 mol/L de peryodato de sodio, la velocidad de cambio fue lenta, no se observó una coloración uniforme en toda el área de prueba y no fue posible diferenciar concentraciones de glucosa.

Al aumentar el grado de oxidación del papel los porcentajes de inmovilización fueron mayores, aumentó también la velocidad de la reacción y la intensidad de la coloración para las diferentes concentraciones de glucosa.

En el papel activado con peryodato de sodio 0,20 mol/L (41,3 % de inmovilización) se observó el cambio cromático inmediatamente y la intensidad de color permitió una clara diferenciación de las concentraciones de glucosa ensayadas.

Lógico resulta que la mejor respuesta corresponda al mayor grado de oxidación, pues es precisamente donde existen mayor cantidad de grupos disponibles para el enlace enzima soporte.

En todos los casos, los porcentajes de inmovilización obtenidos fueron bajos, lo cual es característico de la inmovilización covalente.

SUMMARY

Due to their catalytic function, enzymes have a wide application in a considerable number of technological processes and during the last 15 years there have been significant advances in industry. Within the Pharmaceutical and Biological Industry, that one devoted to diagnostic tools have also received the impact of the introduction of this type of products, supporting at present technologies as important as the enzyme immunoassay, the diagnosis in clinical chemistry and dry chemistry, where the immobilization techniques attain an increasingly higher development as a result of the increase of stability achieved with these systems. Covalent immobilization assays of glucose oxidase and peroxidase of Whatman No. 2 filter paper are presented. 2 variants were assayed: the covalent immobilization of a soluble polymer of enzymes and the covalent immobilization of a solution of free enzymes. The results of the process were evaluated against reference glucose solutions in concentrations between 2,0 and 55,0 mmol/L. The best responses were obtained with the lowest immobilization percent in the case of the polymer binding, whereas the highest degree of immobilization was obtained with the solution of free enzymes.

Subject headings: ENZYMES, IMMOBILIZED/metabolism; GLUCOSE OXIDASE/metabolism; PEROXIDASES/metabolism.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Papkovski DB, Savitski AP, Yaropolov AI, Panomares GV, Rumyantseva VD, Mironov AF. Flow injection glucose determination with long wavelength luminiscent oxygen probe. *Biomed Sci* 1991;2(1):63.
2. Miyazaki T, Omoto K. Reagent for detection of glucose in urine and other body fluids based on color changes. *Jp* 60, 178, 358.(85,178.358) Cl. G01N33/66 7 pp. 12 Sept. 1985. *Appl* 84/33,788.
3. Ionescu F. Test strip for testing sugar with a copolymer system of glucose oxidase-peroxidase. 10 July 1978. *Appl.* 80,656.1974.
4. Chen C. A biocompatible needle-type glucose sensor based on platinum electroplate carbon electrode. *Appl Biochem Biotechnol* 1992; 36(3):211-26.
5. Mekkelsen S, Lenox R. Rotating disc electrode characterization of glucose oxidase. *Anal Biochem* 1991;195 (2):358-63.
6. Male K, Luong J. Determination of urinary glucose by flow injection analysis amperometric biosensor and ion exchange chromatography. *Appl Biochem Biotechnol* 1992;37(3):243-54.
7. Fisher A. Preparation of immunosorbents with very low non specific binding properties using periodate oxidized crosslinked sepharose. *Affinity chromatography and Biological Recognition*. Londres: Ed. Irwen M. Chai Ken Meir Wilchek. Indu; 1983,515.

Recibido: 2 de noviembre de 1999. Aprobado: 8 de diciembre de 1999.

Ing. *Yuria Bilbao Abraham*. Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay". Infanta No. 1162, municipio Centro Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.