

ELABORACION DE ELECTRODOS ENZIMATICOS CON UTILIDAD DIAGNOSTICA

M. Borrajero y C. Pascual

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba Recibido: 19 de abril de 1991

RESUMEN. Se describe la preparación de electrodos enzimáticos para la determinación de glucosa, ácido láctico y urea en muestras de suero sanguíneo, empleando un método para la inmovilización de enzimas glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa y ureasa sobre electrodos de platino. Se reportan los rangos de concentración de los distintos metabolitos para los cuales la respuesta del electrodo fue lineal, así como los coeficientes de variación hallados para réplicas intra-día (n=10). Los electrodos realizaron la determinación de los distintos metabolitos en las muestras de suero en un rango de concentraciones que abarcó en todos los casos el intervalo normal y parte del rango patológico.

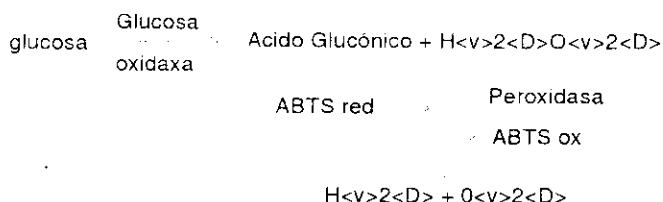
ABSTRACT. The preparation of enzymatic electrodes for glucose, lactate and urea determination in serum samples is described. Glucose oxidase, lactate dehydrogenase and urease were immobilized over platinum electrodes. The concentration range determined by a linear response of the corresponding electrode is shown as well as the variation coefficient calculated by intraday replications (n=10). Each electrode performed the determination of the corresponding metabolite in serum samples in the normal and part of the pathological concentration range.

INTRODUCCION

La inmovilización de enzimas para su aplicación al diagnóstico clínico constituye en la actualidad una tecnología en activo desarrollo.¹ Se reporta un gran número de métodos para la inmovilización,^{2,3,4} así como el empleo de diferentes elementos (electrodos modificados,^{5,6} electrodos selectivos,^{7,8} fibra óptica,^{9,10} etc.) como base para la inmovilización.

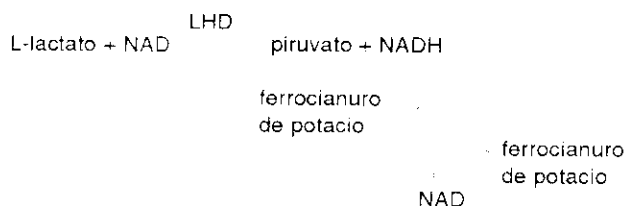
En este trabajo se describe la elaboración de electrodos enzimáticos para detección de glucosa, urea y ácido láctico mediante una metodología común y las condiciones de trabajo en cada caso.

El fundamento para la detección de glucosa lo constituye la reacción:



El paso del compuesto ABTS (sulfonato de 2,2 azino-di(3 etilbenzotiazolina-6) del estado reducido al oxidado se acompaña de un cambio relativamente grande en el potencial de la mezcla de reacción, el cual se registra a través de un sistema potenciométrico y es proporcional a la cantidad de glucosa presente.

El lactato en presencia de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se transforma:



El paso del ferricianuro a su estado reducido se acompaña de un cambio del potencial de la mezcla que es proporcional a la cantidad de L-lactato presente.

La urea en presencia de enzima ureasa se escinde en amonio (NH_4^+ y anión hidrogenocarbonato (HCO_3^-), produciendo un aumento de pH que obedece a la cantidad de urea presente.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos químicos. Acrilamida, TEMED, acetato de uranilo, fosfato de potasio, EDTA, hidrato de hidrazina, persulfato de amonio, urea, albúmina sérica bovina, lactato de calcio y metanol (BDH); glioxal y ferrocianuro de potasio (Merck); metacrilamida (Aldrich).

Reactivos enzimáticos. Peroxidasa 10 UI/mg (BDH), glucosa oxidasa 200 $\mu\text{I}/\text{mg}$ (Boehringer Mannheim), lactato deshidrogenasa 300 $\mu\text{I}/\text{mg}$ (Oriental), Ureasa 30 $\mu\text{I}/\text{mg}$ (Sigma).

Preparación de los electrodos. Antes de proceder a la inmovilización se limpiaron los electrodos mediante inmersiones alternas en HCL 1 mol/L y NaOH 1 mol/L y posteriormente en HCL 0,1 mol/L por 5 h.

Preparación del polímero. Se obtuvo un derivado hidrazina del polímero acrilamida-metacrilamida según metodología descrita por Tor y Freeman.¹¹ Se emplearon 6,5 g de acrilamida y 3,36 g de metacrilamida, que polimerizaron a 40 °C durante 1 hora en presencia de TEMED 92 mmol/L y persulfato de amonio 17,5 mmol/L. El derivado se precipitó en metanol frío y se secó con pentóxido de fósforo al vacío.

Electrodo de glucosa. Aproximadamente 0,2 mg de glucosa oxidasa se disolvieron en 20 L de una solución compuesta por 100 L del polímero al 25 % en agua, 10 L de fosfato de potasio 2 mol/L (pH 8), 2 L de albúmina sérica bovina 1 % y 25 L de agua. Se depositó una fina capa de la mezcla sobre la superficie de platino y se dejó secar bajo rotación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se introdujo el electrodo en glioxal 1 % frío durante 1 h y se lavó con solución amortiguadora de fosfato (S.A.) 50 mmol/L (pH 7) durante 10 minutos con agitación magnética suave (180 r/min).

Las mediciones se realizaron con ayuda de un electrodo de calomel saturado como referencia y un registrador de pH (Radiometer) empleado como milivoltímetro.

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 0,5 mL de solución de glucosa (soluciones patrones acuosas o sueros sanguíneos desproteinizados con acetato de uranilo 1,61 mmol/L en la proporción 1:20), 4 mL de agua y 1,5 mL de ABTS 1 mg/mL peroxidasa 0,8 UI/mL en S.A. de fosfato 250 mmol/L (pH 7). Se registró el cambio de potencial en 1 minuto de reacción con agitación magnética suave. La concentración de glucosa se determinó paralelamente mediante el método espectrofotométrico convencional (God-Perid, Boehringer Mannheim).

Electrodo de lactato. Se disolvieron 2 mg de LDH en 20 L de una solución compuesta por 160 L del polímero al 25 %, 10 L de fosfato de potasio 2 mol/L (pH 8), 2 L de albúmina sérica bovina 1 % y 25 L de agua. El método de inmovilización fue el ya descrito y la mezcla de reacción estuvo compuesta por 1,5 mL de ferricianuro de potasio 20 mmol/L, NAD 1,5 mmol/L en S.A. de pirofosfato 10 mmol/L (pH 9) y 0,5 mL de solución de lactato (soluciones patrones acuosas o sueros sanguíneos desproteinizados con ácido perclórico 1 mol/L en la proporción 1:1 y neutralizados con fosfato dibásico de potasio 1 mol/L en la proporción 1:1).

Se registró el cambio de potencial en 30 s bajo agitación magnética suave. La concentración de lactato se determinó paralelamente mediante técnica espectrofotométrica.¹²

Electrodo de urea. Se disolvió 1 mg de ureasa en 100 L de una solución que contiene 15 L del polímero al 25 %, 10 L de EDTA 5 mmol/L, 5 L de fosfato de potasio 2 mol/L (pH 8) y 60 L de agua. La

inmovilización se realizó según el método descrito sobre el bulbo de un electrodo de pH. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 1 mL de suero y 5 mL de S.A. de histidina 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L (pH 7,6). Se registró el cambio de pH durante 2 min de reacción. Se empleó un suero mezcla, integrado por muestras procedentes de varios donantes, debidamente homogeneizado y dializado contra solución salina fisiológica, al que se añadieron por pesada analítica distintas cantidades de urea entre 2,5 y 10 mmol/L.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 1 muestra la dependencia entre el cambio de voltaje y la concentración de glucosa en soluciones patrones. Con el valor de la cotangente se calculó la concentración de 10 muestras de suero entre 5 y 14 mmol/L. La correlación entre estos valores y los hallados mediante la técnica espectrofotométrica fue de 0,997, siendo el coeficiente de variación para 10 repeticiones en el día a concentración de 5 mmol/L de 3,8 %.

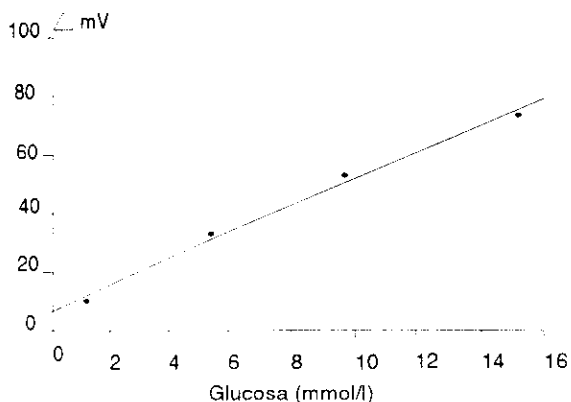


Fig.1. Dependencia entre el cambio de potencial (mV) Durante 1 min de reacción y la concentración de glucosa en soluciones patrones.

Después de un mes de su preparación este electrodo mantuvo la linealidad de la respuesta en el rango estudiado, con un cambio de voltaje de 3,5 mV por mmol/L de glucosa (al día siguiente de su preparación la respuesta del electrodo fue de 5,3 mV por mmol/L de glucosa)(Fig.1).

La Figura 2 muestra la dependencia entre el cambio de voltaje y la concentración de lactato en soluciones patrones. Con el valor de la cotangente se calculó la concentración de lactato de 8 muestras

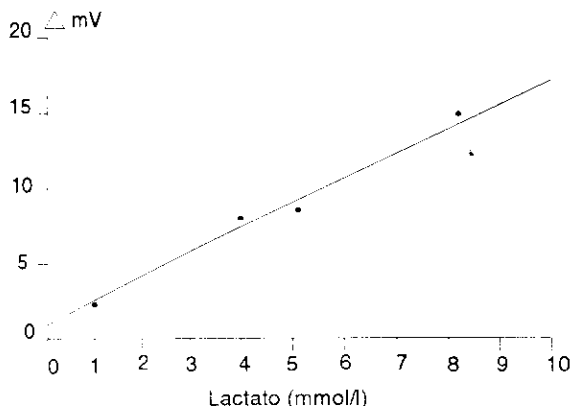


Fig.2. Dependencia entre el cambio de potencial (mV) en 30 s de reacción y la concentración de lactato en soluciones patrones.

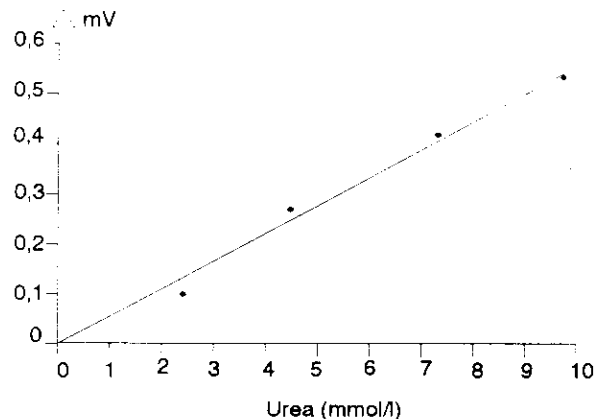


Fig.3. Dependencia entre el cambio de pH durante 2 min de reacción y la concentración de urea en sueros empleados como patrones.

de suero, cuyos valores fluctuaban entre 1 y 10 mmol/L. Se obtuvo una correlación de 0,98 con respecto a los valores respectivos obtenidos por el método espectrofotométrico. El coeficiente de variación fue de 9,5 % para 10 repeticiones en el día a concentración de 5 mmol/L.

Teniendo en cuenta que la metodología empleada para la inmovilización es la misma, es posible que la mayor variabilidad encontrada en la respuesta del electrodo de lactato se deba a la preparación de la muestra, puesto que pequeñas cantidades de proteína contaminante pueden reducir NAD de forma inespecífica, alterando el resultado del ensayo.

La Figura 3 muestra la dependencia entre la concentración de urea en sueros empleados como patrones y el cambio de pH. Se hicieron 10 réplicas de cada punto y el coeficiente de variación osciló entre 17 % (2,5 mmol/L) y 4,7 % (10 mmol/L). El coeficiente de correlación fue de 0,99.

Un suero dializado está privado de gran número de sales que normalmente contribuyen al mantenimiento del pH. Sin embargo la mayor contribución al mantenimiento de la homeostasis en este caso está dado posiblemente por las proteínas séricas que se encuentran en altas concentraciones (6 a 8 % en sujetos normales y superiores en sujetos con determinadas patologías). Para la realización de esta determinación debe por lo tanto tomarse en cuenta la capacidad amortiguadora del suero sanguíneo que puede ser diferente entre sujetos y afectar el resultado. Una vía posible de solución puede ser duplicar la muestra y realizar una determinación en presencia y otra en ausencia de un estándar interno de urea.

Con respecto a otros métodos de inmovilización ensayados, empleando gel de poliácridamida o unión con glutaraldehído, este permite obtener membranas enzimáticas muy finas que no requieren de ningún tipo de soporte o recubrimiento y cuyos tiempos de respuesta son cortos. Para ello se precisa de la síntesis previa de un polímero y de gran cuidado en la manipulación, por tratarse de membranas frágiles que se obtienen por secado y posterior fijación de una película muy fina que contiene la enzima.

CONCLUSIONES

Se elaboraron electrodos enzimáticos para la detección de distintos metabolitos en muestras de suero sanguíneo. Para ello se empleó una metodología común de inmovilización de enzimas que presenta determinadas ventajas. Los electrodos cuantificaron sus respectivos metabolitos con bastante exactitud en los rangos de concentración estudiados, que abarcan en todos los casos los niveles normales y parte del rango patológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Gunasingham H., Tan C., Aw T. *Clinical Chemistry* 9, 1657, 1990.
2. Demura M., Asakura T., Kuroo T. *Biosensors* 4, 361, 1989.
3. Sternberg R., Barrau M.B., Gangiotti L., Thevenot D. *Biosensors* 4, 27, 1988.
4. Galiatsatos C., Ikariyama Y., Mark J., Heineman W. *Biosensors & Bioelectronics* 5, 47, 1990.
5. Trojanowick M. *Biosensors & Bioelectronics* 5, 149, 1990.
6. Tsuji I., Eguchi H., Yasukouchi K., Unoki M., Tinaguchi I. *Biosensors & Bioelectronics* 5, 87, 1990.
7. Schoot B., Bergveld P. *Biosensors* 3, 161, 1887-88.
8. Alegret S., Martínez-Fábregas E. *Biosensors* 4, 287, 1989.
9. Scaffar B. *Biosensors & Bioelectronics* 5, 137, 1990.
10. 10. Trettnak W., Leiner M., Wolfbeis O. *Biosensors* 4, 15, 1988.
11. Tor R., Freeman A. *Analytical Chemistry* 58, 1042, 1986.
12. Olson G. F. *Clinical Chemistry* 1, 8, 1962.

Este equipo se emplea en la medición de la tensión superficial en fluido amniótico. Requiere solamente 2 min y 1,5 mL de líquido y diagnostica la madurez pulmonar fetal con una precisión igual o mayor que otras pruebas corrientes en uso que requieren procedimientos de laboratorios por varias horas

SURFACTOMETRO PARA EL ANALISIS DE LA MADUREZ PULMONAR FETAL EN EL NIÑO RECIEN NACIDO

SURFAS

Producido y exportado por: CNIC

Centro Nacional de Investigaciones Científicas./ Ave. 25 y calle 58, Cubanacán, Playa, C. de La Habana, Cuba.
Apartados Postales 6880 y 6990 / Teléfono: 21 8066 / Teléx: 51 1582 CNIC CU