



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INCORPORACIÓN DE BIOSENSORES A SISTEMAS DE
FLUJO CONTINUO PARA DETERMINACIONES
ANALITICAS

TESIS

Que para obtener el grado de :

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

(Química Analítica)

presenta

Q. LUCÍA | HERNÁNDEZ GARCADIEGO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

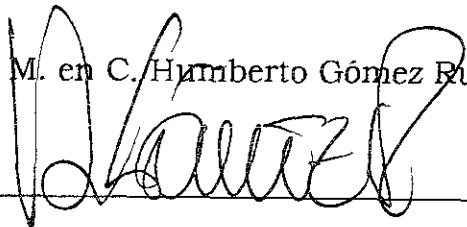
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. María Antonia Dosal Gómez
VOCAL: Dr. Eduardo Bárzana García
SECRETARIO: Dra. Araceli Peña Álvarez
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Francisco Rojo Callejas
SEGUNDO SUPLENTE: Dra. María del Pilar Cañizares Macías

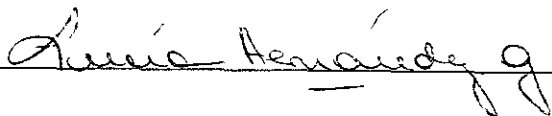
LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Química Analítica
Laboratorio de Espectrometría de Masas, División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: M. en C. Humberto Gómez Ruiz



Sustentante: Q. Lucía Hernández Garciadiego



CONTENIDO

Página

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA	7
1.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	9
1.3.1. Métodos de inmovilización de enzimas	10
1.3.2. Efecto de la inmovilización en la actividad enzimática	11
1.4. UREASA	
1.4.1. Estructura	16
1.4.2. Degradación de la urea	16
1.4.3. <i>Inhibición de la ureasa por mercurio</i>	18
1.4.4. Regeneración de la ureasa	19
1.4.5. Inmovilización de la ureasa	20
1.4.6. Determinación de urea	24
CAPÍTULO 2	
REACCIONES ENZIMÁTICAS EN ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO	
2.1. GENERALIDADES	26
2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR FIA	
2.2.1. Configuraciones en flujo detenido	28
2.2.2. Sistemas abierto-cerrado	30
2.3. VELOCIDAD DE REACCIÓN EN REACTORES ENZIMÁTICOS	31
2.3.1. Tubo recto abierto	32
2.3.2. Reactores empacados	34
2.3.3. Inhibición en reactores enzimáticos	36

CAPÍTULO 3	
PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1. INMOVILIZACIÓN DE LA UREASA	
3.1.1. Inmovilización en alginato	41
3.1.2. Inmovilización en vidrio de poro controlado (CPG)	42
3.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA	43
3.2.1. Ureasa en disolución	
3.2.1.1. Determinación de amonio por FIA	44
3.2.1.2. Determinación enzimática de urea	46
3.2.1.3. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa	46
3.2.2. Ureasa en alginato	
3.2.2.1. Determinación de amonio/urea	49
3.2.2.2. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa	50
3.2.3. Ureasa inmovilizada en CPG	
3.2.3.1. Determinación de amonio/urea	51
3.2.3.2. Integración de un biosensor para la determinación de la actividad enzimática de la ureasa	52
3.3. INHIBICIÓN DE UREASA POR MERCURIO	53
3.3.1. Optimización del tiempo de inhibición	54
3.3.2. Regeneración de la enzima por tiempo	55
3.3.3. Regeneración de la enzima por pulso	56
CAPÍTULO 4	
RESULTADOS	
4.1. INMOVILIZACIÓN DE LA UREASA	
4.1.1. Inmovilización en alginato	58
4.1.2. Inmovilización en vidrio de poro controlado	58
4.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA	59
4.2.1. Ureasa en disolución	
4.2.1.1. Determinación de amonio por FIA	59
4.2.1.2. Determinación enzimática de urea	61
4.2.1.3. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa	63
4.2.2. Ureasa en alginato	
4.2.2.1. Determinación de amonio/urea	69
4.2.2.2. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa	73
4.2.3. Ureasa inmovilizada en CPG	
4.2.3.1. Determinación de amonio/urea	77
4.2.3.2. Integración de un biosensor para la determinación de la actividad enzimática de la ureasa	80

4.3. INHIBICIÓN DE UREASA POR MERCURIO	
4.3.1. Optimización del tiempo de inhibición	86
4.3.2. Regeneración de la enzima por tiempo	87
4.3.3. Regeneración de la enzima por pulso	88
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95

INTRODUCCIÓN

El creciente avance en el desarrollo de metodologías analíticas ha provocado que dentro de los objetivos básicos de la Química Analítica actual se encuentren la automatización y miniaturización, la inmovilización, desarrollo de sensores y (bio)sensores, el mejoramiento de la calidad en los laboratorios analíticos, con el consecuente desarrollo de nuevos instrumentos, (1) teniendo en cuenta que los aspectos básicos de la Química Analítica son selectividad, sensibilidad, precisión y rapidez (2). En este contexto, el desarrollo de los métodos automáticos de análisis, y dentro de ellos el Análisis por Inyección en Flujo (FIA por sus iniciales en inglés) ha sido de gran importancia para la resolución de diferentes necesidades analíticas.

El primer artículo de FIA se publicó en el *Analytica Chimica Acta* en 1975 (3), y desde entonces hasta 1986, el crecimiento en el número de artículos publicados continuó a gran velocidad, como puede observarse en la figura 1 (4, 5, 6). En 1987 se reportaron 1400 publicaciones, 5300 artículos para 1994, además de más de 15 monografías, en 1999 se tienen reportados alrededor de 8500 artículos de FIA. Estos números demuestran el impacto que tiene el FIA en la Química Analítica moderna (7).

El creciente interés en el desarrollo de metodologías por FIA puede deberse a varias razones, por ejemplo: la mayor selectividad que puede lograrse en métodos por FIA, en comparación a sus contrapartes manuales. Ésta es debida al carácter cinético inherente de esta técnica, que puede ser aprovechada de diversas formas (8). Su gran versatilidad ha favorecido el desarrollo de un gran número de alternativas para modificar la sensibilidad, ya sea incrementando la señal (flujo detenido, paso iterativo del bolo a través del punto de detección, uso de reactivos sólidos) o bien disminuyéndola (dilución o pseudo-dilución, cambios en las velocidades de flujo o volúmenes de muestra) (9).

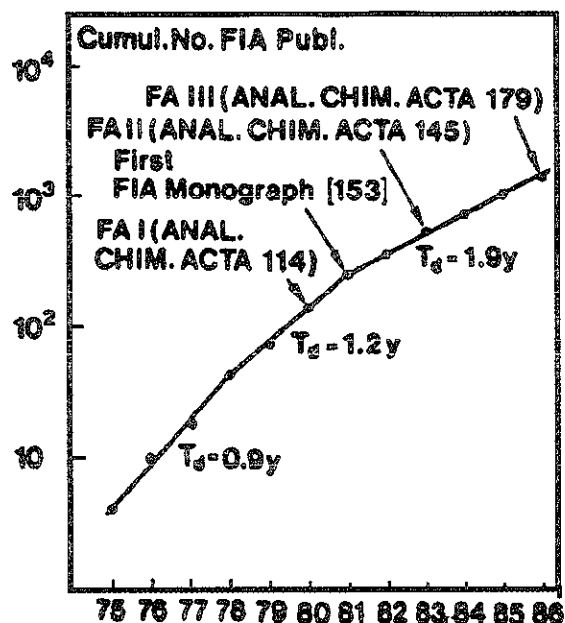


Fig. 1. Crecimiento de las publicaciones en FIA desde 1975 a 1986 como está publicado en (6). FA I-III se refieren a las tres conferencias internacionales en análisis en flujo, iniciadas en 1979 en Amsterdam y que tienen lugar cada tres años. T_d se refiere al tiempo en que se duplica el número de publicaciones.

Durante el desarrollo de la técnica de inyección en flujo, ha sido posible la resolución de problemas analíticos más complejos, integrando a la configuración FIA el proceso de preparación de la muestra, como la introducción de muestras sólidas en una configuración (10) y la gran variedad de técnicas de separación (11).

Dentro de este mismo contexto, se han desarrollado (bio)sensores con el objeto de incrementar la selectividad y la sensibilidad en la determinación de especies moleculares en matrices complejas, minimizando operaciones preparativas (12). Se puede definir un (bio)sensor como un sistema que consta de dos transductores, uno bioquímico y uno físico, que se encuentran en contacto uno con el otro, a fin de relacionar la concentración de un analito a una señal, generalmente eléctrica medible (13).

Dentro del desarrollo de los (bio)sensores, de especial interés ha sido la combinación de la técnica de inyección en flujo con los métodos enzimáticos de

análisis. Es muy ventajoso converger la velocidad y simplicidad del Análisis por Inyección en Flujo con la selectividad de los métodos enzimáticos.

Una configuración continua utilizada en conjunción con un (bio)sensor puede realizar una gran variedad de funciones, dependiendo de la naturaleza de la muestra y del analito, del tipo de sensor en cuestión y del tipo de detector utilizado (14). Entre tales funciones se pueden mencionar:

- a) Transferencia de la muestra inyectada o aspirada hasta el (bio)sensor
- b) Acondicionamiento de la muestra
- c) Mantenimiento y/o regeneración del (bio)sensor
- d) Desarrollo de métodos cinéticos
- e) Ampliación del campo de aplicación

Desde principios de la década de los 80's, el uso de enzimas inmovilizadas en FIA se ha incrementado de manera considerable. Esto es debido a las ventajas que conlleva la inmovilización de las enzimas, que ayuda a resolver los dos mayores inconvenientes en el uso de estos catalizadores: inestabilidad y alto costo. Por otro lado, al integrar un reactor empacado con enzima inmovilizada a una configuración FIA, se combina el carácter dinámico de la técnica con el carácter cinético de la reacción enzimática. Sin embargo, dependiendo del método de inmovilización utilizado, el comportamiento de la enzima puede variar con respecto a su comportamiento en disolución.

Es por esta razón que en el presente trabajo se estudió del comportamiento de la ureasa en un sistema de flujo continuo. Para esto se determinó la actividad enzimática de esta enzima, dentro de un sistema de flujo continuo, inmovilizada por medio de dos métodos diferentes, uno físico, atrapando la enzima en una red polimérica, y uno químico, en donde se establece al menos un enlace covalente entre la enzima y el soporte sólido. Se eligió la ureasa ya que ésta es una enzima cuyo mecanismo catalítico, propiedades fisicoquímicas y estructura ha sido ampliamente estudiada (15, 16, 17), no presenta cambios significativos en la actividad enzimática en intervalos

amplios de temperatura y pH, lo cual se traduce en reproducibilidad de resultados y facilidad de manejo.

En la primera parte del trabajo se estableció la determinación espectrofotométrica de amonio (producto de la reacción enzimática) en una configuración FIA, la determinación de la urea utilizando la enzima ureasa en disolución e integrando un reactor empacado con la enzima inmovilizada en alginato y en vidrio de poro controlado, comparando los resultados obtenidos de los tres sistemas. Por último se determinó la actividad de la ureasa por la técnica de Análisis por Inyección en Flujo utilizando una configuración abierto-cerrado y flujo detenido. Esta determinación se realizó con la enzima tanto en disolución como inmovilizada en vidrio de poro controlado y en alginato. Para evaluar la actividad enzimática de la ureasa se siguieron dos aproximaciones: a) el procedimiento bioquímico clásico que consiste en la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad inicial máxima ($(V_0)_{max}$) y b) la aproximación cromatográfica del cuasi-equilibrio dinámico adsorción-reacción-desorción.

Las enzimas pueden ser utilizadas para la determinación del compuesto al cual son específicas, o bien, para la determinación indirecta de analitos que la inhiben (11). El hecho de tener la enzima inmovilizada en soporte sólido integrado al sistema de flujo continuo puede ser muy ventajoso, ya que la enzima puede ser inhibida y regenerada de manera secuencial.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la inhibición de la enzima por mercurio, y la regeneración de la misma utilizando un agente acomplejante del mercurio, el EDTA, optimizando el tiempo de inhibición, longitud de reactor enzimático y configuración para la regeneración de la enzima, a fin de obtener resultados reproducibles y relacionar el decremento de la señal analítica con la concentración del mercurio.

OBJETIVOS

El objetivo general que se del presente trabajo fue evaluar enzimas inmovilizadas para ser utilizadas como biosensores (detectores) en línea y como reactor enzimático. Para ello se seleccionó como enzima a la ureasa, y la reacción catalizada por ella (hidrólisis de urea) para obtener amonio. El estudio incluye la evaluación de la actividad de la enzima en disolución como elemento de comparación con la enzima inmovilizada.

Sabiendo que ciertos metales inhiben la actividad de las enzimas, se seleccionó el mercurio en el caso de la ureasa y a partir de ello se diseñó un método analítico para la determinación indirecta del metal, empleando a la enzima como reactor.

De ello se derivan los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar el método de determinación de amonio y urea por FIA, que comprende el planteamiento de las variables químicas y variables FIA adecuadas para obtener la señal más intensa manteniendo el tiempo de análisis adecuado.
- Comparar la actividad enzimática de la enzima dentro de un sistema de flujo continuo en disolución e inmovilizada, que involucra la adquisición de datos cinéticos en un sistema abierto-cerrado y de flujo detenido.
- Estudiar los mecanismos de inhibición-regeneración de la enzima para optimizar el uso de ésta en la determinación de metales.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

Durante la segunda mitad del siglo XX se ha tenido un significativo avance en el conocimiento y uso de las enzimas tanto en investigación básica como en aplicaciones industriales. En el campo de la Química Analítica, la aplicación de las enzimas se encuentra bien documentada (18, 19). Los inconvenientes que limitan el uso de las enzimas son su escasez, alto costo, inestabilidad y la poca familiaridad en general de su comportamiento (20). Los avances en producción, aislamiento y purificación de las proteínas han incrementado la disponibilidad de las enzimas, al mismo tiempo que han abatido su costo.

Las enzimas tienen naturaleza proteica y están especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Su estructura es el resultado de la condensación de los aminoácidos, sus constituyentes fundamentales. El número de aminoácidos y su posición específica en la secuencia determina en gran medida la función, tamaño y forma de la proteína. Esta secuencia de aminoácidos o estructura primaria es de gran importancia, y da lugar a la estructura tridimensional de la proteína. Se reconocen tres clases de relaciones espaciales: la estructura secundaria, que da la relación entre los aminoácidos vecinos uno a otro en la estructura primaria; la estructura terciaria, que se refiere a la relación de los constituyentes más lejanos en la estructura primaria; y la estructura cuaternaria, que da las relaciones espaciales de las cadenas peptídicas en proteínas multicadenadas.

Las enzimas se distinguen de otras clases de proteínas debido a la existencia de un área geométrica en su estructura que facilita la catálisis. Es decir, la catálisis está íntimamente relacionada con las interacciones moleculares que tienen lugar entre la molécula del sustrato y los componentes de la molécula de la enzima. La pequeña porción de la enzima, implicada en la fijación y posicionamiento del sustrato, así como en la reacción de catálisis, delimita una zona denominada sitio activo.

Las características del sitio activo se pueden resumir como sigue:

1. El sitio activo constituye una pequeña porción de la estructura de la enzima.
2. La especificidad de la enzima depende del arreglo de los átomos en el sitio activo.
3. El proceso de unión de la enzima-sustrato involucra una cantidad relativamente pequeña de energía (3-12 Kcal/mol).

El mecanismo mediante el cual el sitio activo toma parte en la reacción fue postulado por primera vez por Emil Fisher en 1860. La especificidad de la reacción, según Fisher, es el resultado de un sistema de "cerradura y llave" entre la enzima y el sustrato, esto es, son estereoquímicamente complementarios. Para este modelo, es necesario considerar dos puntos:

1. El complejo inducido resulta de un proceso de reconocimiento dinámico, esto es, el cambio de conformación molecular favorece la especificidad.
2. La enzima induce una tensión electrónica en el sustrato para facilitar el incremento en la velocidad de reacción.

La actividad catalítica de una enzima es proporcional al número de sitios activos que operan al momento de la reacción, y se expresa como unidades de actividad de la enzima.

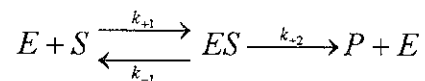
1.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por enzimas, pero éstas presentan un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas: la saturación con el sustrato.

A una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial de la reacción es casi proporcional a esta concentración, por lo tanto es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. Sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración del sustrato; en esta zona, el orden de la reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de su concentración y se aproxima asintóticamente a

una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice entonces que la enzima se encuentra saturada con el sustrato. Todas las enzimas muestran el efecto de saturación, pero varían ampliamente con respecto a la concentración de sustrato que se necesite para que se manifieste.

L. Michaelis y M.L. Menten desarrollaron en 1913 una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas, la cual fue ampliada posteriormente por G.E. Briggs y J. B. S. Haldane. Esta teoría supone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima-sustrato ES, el cual se descompone en una segunda etapa, para formar el producto P y liberar nuevamente la enzima libre:



Para este equilibrio, la ecuación de velocidad está descrita por:

$$V_0 = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{(k_{-1} + k_{-2})/k_{+1} + [S]} \quad (1.1.)$$

$$V_0 = \frac{(V_0)_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1.2.)$$

En donde K_M es la constante de Michaelis-Menten.

La ecuación (1.2.) muestra que $K_M = [S]$ cuando la velocidad inicial es igual a la mitad del valor de la velocidad inicial máxima.

Ya que

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_{+1}}$$

si $k_{-1} \gg k_{-2}$, $K_M = k_{-1} / k_{+1}$ y la constante de Michaelis-Menten representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, es decir, el valor de K_M es una medida de

la afinidad de la enzima por el sustrato (21); por el contrario, si $k_{+2} \gg k_{-1}$, $K_M = k_{+2} / k_{-1}$ y la constante de Michaelis-Menten es considerada una constante cinética (22).

Para evaluar la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima, es más conveniente utilizar una relación lineal. La más frecuentemente utilizada es la trasposición propuesta por Lineweaver y Burke, en donde la ecuación (1.2.) se escribe como:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{(V_0)_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{(V_0)_{\max}} \quad (1.3.)$$

Al graficar $1/V_0$ como función de $1/[S]$ se obtiene una recta con pendiente $K_M / (V_0)_{\max}$ y ordenada al origen $1/(V_0)_{\max}$.

Otra ecuación que se utiliza comunmente es la propuesta por Hofstee y Eadie que se obtiene multiplicando la ecuación (1.3) por $V_0 * (V_0)_{\max}$:

$$V_0 = -K_M \frac{V_0}{[S]} + (V_0)_{\max} \quad (1.4.)$$

Una tercera alternativa, propuesta por Hanes, es graficar la ecuación:

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{1}{(V_0)_{\max}} [S] + \frac{K_M}{(V_0)_{\max}} \quad (1.5.)$$

Cabe hacer notar que, a pesar que el mecanismo propuesto por Michaelis-Menten puede ser aplicado para muchas reacciones enzimáticas, un gran número de enzimas no siguen este modelo simple.

1.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La especificidad en la acción de las enzimas y las condiciones tan suaves en las cuales funcionan les confieren una gran ventaja sobre los catalizadores químicos ordinarios. Sin embargo, el alto costo de los procedimientos de extracción y de purificación de las enzimas y en algunos casos su inestabilidad cuando están en disolución, son un obstáculo para su recuperación después de haber sido utilizadas. Es posible unir las enzimas a una matriz insoluble por una gran variedad de métodos y de

esta manera la enzima puede ser reutilizable y reducir de manera significativa los costos.

La inmovilización sobre un soporte insoluble facilita el desarrollo de reactores en continuo, que funcionan durante períodos largos, sin necesidad de renovar el catalizador.

1.3.1. Métodos de inmovilización de enzimas

En vista de la gran variedad de enzimas y reacciones catalizadas por la misma enzima, se han desarrollado una gran cantidad de métodos de inmovilización, que en general pueden clasificarse en métodos físicos, métodos químicos y métodos híbridos (23, 24).

Los métodos físicos incluyen a todos aquellos que no involucran uniones covalentes. Los métodos de adsorción de una enzima en un material insoluble son los más simples para obtener conjugados enzima-soporte. Estos consisten básicamente en poner en contacto una disolución acuosa de la enzima con el material activo por un período de tiempo determinado, después del cual, el exceso de enzima es lavado de la matriz insoluble. Se utilizan diversos materiales en la preparación de estos complejos enzima-matriz, algunos de estos son las resinas de intercambio iónico, carbón activado, sílica gel, tierras diatomeas, arcillas, alúmina, vidrio de poro controlado y cerámica.

El mecanismo de adsorción es muy complejo, ya que dependiendo de la naturaleza de la superficie, la unión de la enzima puede ser por interacciones iónicas, adsorción física, uniones hidrofóbicas o interacciones de Van der Waals

Las ventajas de utilizar la adsorción como método de inmovilización de enzimas reside en su simplicidad, la gran variedad de adsorbentes que se pueden utilizar y la reutilización de estos adsorbentes. Entre las desventajas de utilizar estos métodos está la debilidad del enlace de retención.

De los métodos físicos de atrapamiento de la enzima (en red polimérica o en microcápsula semipermeable), una de las características más importantes es que no se afecta la estructura tridimensional de la enzima; por lo tanto, no existe ningún problema

estérico asociado a la unión covalente o electrostática entre la enzima y el polímero, de tal forma que el sitio activo de la enzima no es obstruído por una porción de la matriz polimérica y la pérdida de actividad no puede ser atribuída a interacciones fuertes. En general, los métodos de atrapamiento se desarrollan disolviendo la enzima en una disolución del monómero y posteriormente con el tratamiento adecuado se forma el polímero.

Las ventajas de los métodos de atrapamiento en gel incluyen la gran variedad de formas en las que el gel puede ser utilizado, la simplicidad y las condiciones de preparación relativamente suaves. Las desventajas incluyen el control de numerosos factores experimentales, la posible inactivación de la enzima por los radicales necesarios para la formación del polímero y la restricción del tamaño necesario del sustrato y productos a especies relativamente pequeñas. Otro problema es la pérdida de la enzima de la matriz debido a la heterogeneidad del tamaño de la red polimérica, de donde la enzima tiende a fugarse, especialmente después de intervalos largos de uso.

Los métodos químicos son probablemente los métodos de inmovilización de enzimas más utilizados. Involucran la formación de al menos un enlace covalente irreversible entre la molécula enzimática y los grupos reactivos del soporte. A este tipo de enlace se adicionan siempre los fenómenos de adsorción electrostática que consolidan la fijación.

Son esencialmente tres los pasos en un esquema de inmovilización:

- 1) Activación del soporte.
- 2) Acoplamiento de la enzima.
- 3) Lavado del exceso de enzima.

Existe una gran variedad de soportes sólidos para la inmovilización de enzimas, que comprenden materiales sintéticos, tales como polímeros de acrilamida, de anhídrido maleico, polipéptidos, dacrón, nylon, etc., así como materiales naturales como agarosa, celulosa, vidrio, óxido de níquel, colágeno, magnetita, etc. Los factores que son necesarios de tomar en cuenta para la elección del soporte comprenden la capacidad de unir la proteína, la carga superficial, la estabilidad química y mecánica, la

facilidad de activación, la interacción del soporte con el analito o la matriz de la muestra, el costo, regenerabilidad y disponibilidad.

El proceso de activación del soporte sólido consiste en introducir en la superficie y, con frecuencia dentro de los poros de éste, especies químicas que reaccionan con los grupos activos de la proteína. Existen un gran número de técnicas para realizar este proceso de activación.

1.3.2. Efecto de la inmovilización en la actividad enzimática

En los últimos años se ha investigado mucho con respecto al efecto de la inmovilización en la actividad de la enzima, desde el punto de vista tanto experimental como teórico (25).

El comportamiento de una enzima inmovilizada puede diferir significativamente del de la misma enzima en disolución. En vista de la gran variedad de enzimas, reacciones catalizadas por la misma enzima, matrices sólidas y técnicas de inmovilización estudiadas, no es de extrañar que los resultados sean frecuentemente contradictorios. Se ha observado que una técnica de inmovilización particular puede provocar diferentes cambios en el comportamiento de diferentes enzimas, y que el comportamiento de la misma enzima puede variar con el método de inmovilización empleado.

Para analizar el efecto de la inmovilización en la actividad enzimática, se asume que la enzima está distribuída uniformemente en la matriz sólida y que el sistema es isotrópico (26). Este efecto puede observarse en los siguientes aspectos:

1. El microambiente.
2. Efectos conformacionales y estéricos.
3. Perturbación de la dependencia de la actividad enzimática con el pH.
4. Parámetros cinéticos.

1. El microambiente.

El soporte sólido en el que la enzima es inmovilizada provee a ésta de un microambiente que difiere en muchos aspectos del disolvente en el que la enzima se encuentra suspendida.

Existen dos formas diferentes en las que el soporte sólido puede afectar el micro ambiente que rodea a una enzima inmovilizada: La primera se refiere al efecto de partición. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el soporte sólido puede atraer o repeler al sustrato, producto, inhibidor u otras moléculas a su superficie, concentrándolas o diluyéndolas en la vecindad inmediata de la enzima. La segunda cuando éste se presenta por sí mismo como una barrera para la difusión libre de las moléculas hacia o a partir de la enzima.

2. Efectos conformacionales y estéricos.

Se considera que la facilidad de una enzima para actuar como catalizador específico depende principalmente de dos factores. Primero, la enzima debe estar precisamente en la conformación correcta. Segundo, debe de tener la posibilidad de cambiar su conformación durante la catálisis.

El efecto más obvio al inmovilizar una enzima a un soporte rígido será que la estructura de la enzima se mantiene en una posición, sobre todo si existen varios puntos de unión con el soporte sólido. Si la actividad catalítica de la enzima depende de sus cambios conformacionales, se pueden esperar alteraciones en K_M y/o $(V_0)_{\max}$.

Así mismo, al inmovilizar una enzima por atrapamiento en una red polimérica, la difusión de los sustratos, así como la de los inhibidores, puede verse afectada dependiendo del tamaño de las moléculas. El efecto de restricciones estéricas se observa principalmente cuando se inmovilizan enzimas proteolíticas, ya que los sustratos sobre los cuales actúan estas enzimas tienen pesos moleculares del orden de unos cientos a varios cientos de miles de UMA

3. Perturbación de la dependencia de la actividad enzimática con el pH.

Muchos de los efectos de la perturbación en la dependencia de la actividad enzimática con el pH en enzimas inmovilizadas puede explicarse considerando la distribución de protones a través del sistema y analizando los factores que pueden aumentar o disminuir la acumulación relativa de los protones en el microambiente que rodea la enzima.

Los dos factores que pueden provocar una distribución heterogénea de protones en un sistema de enzima inmovilizada son:

a) Efectos de partición por matrices poli-iónicas: los polianiones tienden a concentrar protones (provocando un decremento en el pH) alrededor de la enzima, mientras que los policationes tienden a repelerlos (ocasionando un aumento en el pH). De esta manera, se ha observado frecuentemente, el desplazamiento del pH óptimo con respecto al de la enzima en disolución en sistemas de enzimas inmovilizadas, dependiendo de la matriz polimérica utilizada (27).

b) Limitación en la difusión del protón: las matrices poliméricas en las que una enzima es inmovilizada pueden actuar como barreras para la libre difusión de los protones. En un sistema de enzima inmovilizada, cuando la concentración del protón es del mismo orden de magnitud al de la concentración de los demás solutos presentes, el efecto en la libre difusión del protón puede ser despreciable comparado con la libre difusión del sustrato o de las moléculas del producto. Sin embargo, las concentraciones de sustratos son generalmente mayores a 10^{-4} M, mientras que las concentraciones del protón son menores a 10^{-7} M. En estas condiciones, puede observarse una restricción de la difusión del protón, mientras que la difusión del sustrato o producto puede no ser significativa comparativamente.

Cuando están presentes ambos efectos (partición y difusión) en el sistema, resulta difícil predecir el efecto del pH en la actividad enzimática. Estos dos efectos pueden combinarse de varias maneras, las cuales pueden agruparse en dos categorías: que ambas limitaciones, difusión y partición, actúen sinérgicamente, o de

manera antagónica. En este último caso, será prácticamente imposible predecir el comportamiento de la enzima al ser inmovilizada.

4. Parámetros cinéticos.

Los parámetros que generalmente se utilizan para describir las características catalíticas de las enzimas son la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad inicial máxima ($(V_0)_{\max}$) que son, por definición, las constantes de la ecuación de velocidad derivada para describir la actividad enzimática en disolución.

Bajo ciertas condiciones, la ecuación que relaciona la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato (ecuación (1.1.)) describe una sección de hipérbola. Cuando se utiliza la modificación propuesta por Lineweaver y Burke (ecuación (1.3.)) se obtiene una línea recta y de esta manera es factible calcular los parámetros K_M y $(V_0)_{\max}$. Sin embargo, existen una serie de factores presentes en sistemas de enzimas inmovilizadas que provocan que en esta gráfica recíproca no se obtenga una línea recta, sino que de por resultado una curva. En estas circunstancias, se vuelve casi imposible determinar K_M y $(V_0)_{\max}$ gráficamente, e inclusive es cuestionable el utilizar estos términos con sus connotaciones matemáticas estrictas. Es por esta razón, que es preferible redefinir los parámetros cinéticos en el caso de enzimas inmovilizadas, encontrando con frecuencia el término de K_M aparente.

M.D. Trevan (25) define el término V_s como la velocidad máxima posible que se obtiene para un sistema dado, o sea, la velocidad que se alcanza cuando la enzima está saturada por el sustrato; y K_v lo define como la concentración del sustrato a la cual la velocidad de reacción es igual a $V_s/2$. Este parámetro refleja las características de la enzima, y depende tanto de los efectos de partición como de los de difusión.

Cabe hacer notar que los aspectos mencionados anteriormente pueden o no estar presentes en el sistema matriz-enzima-sustrato, dependiendo de la naturaleza del proceso de inmovilización, la enzima y los reactivos.

1.4. UREASA

1.4.1. Estructura

La ureasa (EC.3.5.1.5. Urea Amidohidrolasa) fue aislada y cristalizada por primera vez en 1926 de una masa de ejotes molidos (*Canavalia Ensiformis*) por Sumner, quien a la vez demostró que la enzima es una proteína. En su trabajo considera la posibilidad de que la ureasa contenga iones metálicos; descartando fierro y manganeso, ya que para estos metales obtuvo resultados negativos.

Está reportado que la ureasa tiene una masa molecular de 483,000 daltons, tiene 6 sub-unidades con una masa molecular de 83,000 daltons (28). El número total de grupos -SH que pueden ser titulados por nitrato de plata es de 109 ± 7 (29). Estos grupos -SH pueden ser clasificados según su reactividad en tres categorías (30): (a) alrededor de 26-28 grupos reaccionan rápidamente con el p-cloromercurio-benzoato sin pérdida de actividad, (b) otros 22 grupos reaccionan más lentamente con pérdida completa de actividad, y (c) 60-65 grupos que son factibles de ser titulados solamente después de cambios estructurales.

Casi cincuenta años después de los trabajos de Sumner, Dixon y sus colaboradores demostraron que la ureasa aislada de los ejotes es una metaloenzima de níquel, con dos iones de níquel por subunidad, en donde este metal juega un papel esencial en la catálisis (31, 32, 33, 34).

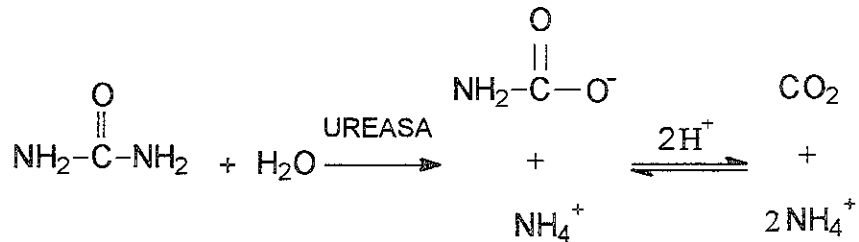
El níquel en la ureasa está unido fuertemente en el sitio activo y la actividad específica de la proteína es proporcional a su contenido de níquel (35).

1.4.2. Degradación de la urea

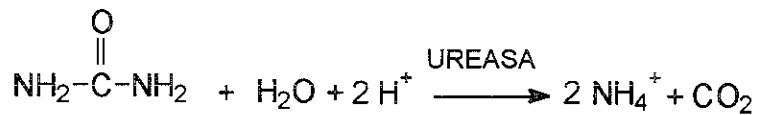
Desde el primer artículo escrito por Sumner en 1926 a la fecha, la ureasa es una de las enzimas cuyo mecanismo catalítico, propiedades fisicoquímicas y estructura ha sido ampliamente estudiada por numerosos investigadores (36, 37).

La degradación no enzimática de la urea en medio acuoso es lenta ($t_{1/2}=3.6$ años a 38°C), y es independiente del pH en un intervalo entre 2 y 12 (17).

La ureasa cataliza la hidrólisis de urea. Los primeros productos de la reacción enzimática son el ion carbamato y el ion amonio.



La reacción global de hidrólisis de la urea es la siguiente:



El estudio del mecanismo mediante el cual la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea ha sido estudiado a partir de los diferentes sustratos de la enzima. Dixon y col. reportan como sustratos de la ureasa a la urea, semicarbazida, formamida, acetamida, N-metil-urea (38). El análisis de estos sustratos y los productos de la reacción enzimática encontrados para cada uno de ellos dió por conclusión que el ion Ni (II) juega un papel muy importante en la acción de la ureasa. El siguiente esquema (Figura 1.1.) muestra el mecanismo de acción de la ureasa. En él se observa que el ion Ni-OH, que actúa como nucleófilo en la ureasa, ataca al carbono del carbonilo de la urea, produciendo un complejo O-carbamato-amonio. El residuo de cisteína sirve como catalizador ácido para promover la pérdida de amonio del aducto tetrahédrico.

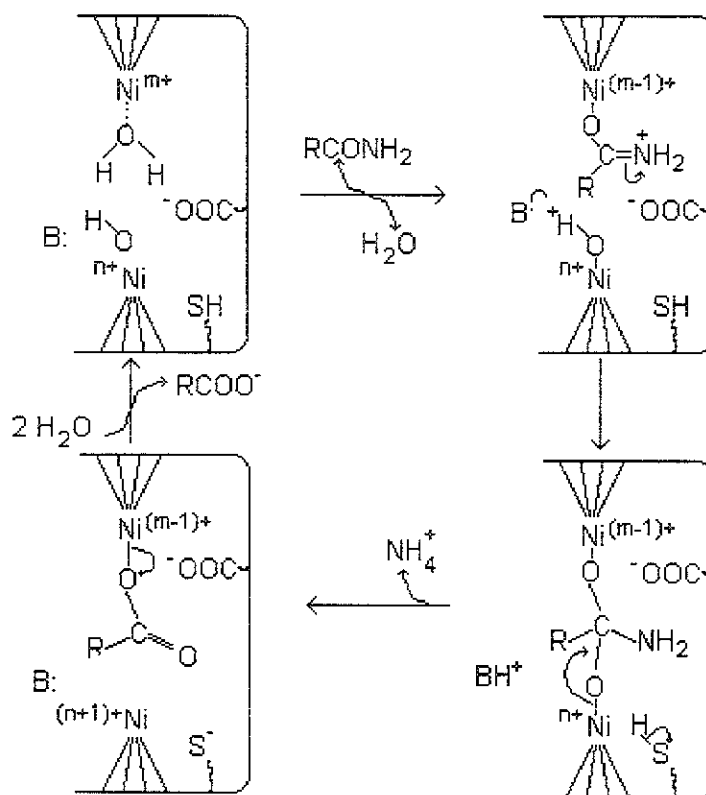


Fig. 1.1. Mecanismo de acción de la ureasa.

1.4.3. Inhibición de la ureasa por mercurio

Se sabe que cantidades traza de algunos metales pueden inhibir la actividad enzimática de la ureasa. Un estudio sistemático de la inhibición de la ureasa por metales fue realizado por Shaw y Raval (39, 40).

En presencia de mercurio, se observa que la ureasa sufre una inhibición del tipo no competitivo, debido a la reacción del catión metálico con los grupos sulfhidrilo de la cisteína, impidiendo entonces el rompimiento del complejo ES. Esta interferencia puede ser estérica, a través de las cadenas laterales de la proteína, o secundaria, alterando su estructura (41).

1.4.4. Regeneración de la ureasa

La inhibición reversible de las enzimas puede ser utilizada para la determinación analítica del inhibidor. Es claro que para que esta determinación resulte conveniente, debe buscarse un mecanismo de regeneración de la enzima, a fin de poder utilizar nuevamente la misma enzima para una concentración diferente del inhibidor. El tener la enzima inmovilizada en un soporte sólido integrado en un sistema de flujo continuo tiene la ventaja de que la enzima puede ser inhibida y regenerada de manera secuencial.

Para regenerar a la ureasa se aprovechan las propiedades de algunos agentes acomplejantes sobre el mercurio. Si el complejo mercurio-acomplejante es más fuerte que el complejo enzima-mercurio, el metal puede ser removido de la enzima quedando ésta regenerada.

La tabla 1.1. muestra los resultados de algunos agentes acomplejantes utilizados por Ögren y Johansson (11).

TABLA 1.1. REGENERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA UREASA PASANDO 2 ML DEL ACOMPLEJANTE EN TRIS-HCL 0.10 M PH 7.0

Acomplejante	Concentración (mM)	Regeneración Relativa (%)	log ^a K
Tioacetamida	10	100	
EDTA	10	100	
EDTA	5	5	15.5 (HgL)
Tioacetamida	5	12	18.7 (HgL ₃)
Tiourea	5	3	20.9 (HgL ₃)
Cisteína	5	620	6.4 (HgL)
Histidina	5	0	13.0 (HgL ₂)
Metionina	5	0	4.0 (HgL ₂)

^aK = constante condicional corregida por los efectos del pH para el ligando y el metal (11).

Ögren y Johansson en la discusión de sus resultados recalcan que al utilizar la cisteína, inicialmente parece ser un agente regenerante muy eficiente, reactivando más enzima que con los otros agentes acomplejantes. Sin embargo, a pesar de que el nivel de actividad obtenida con cisteína se incrementaba con el número de regeneraciones, la sensibilidad con respecto al mercurio como inhibidor decrece significativamente, por lo que este reactivo no es adecuado para el método analítico de determinación de mercurio.

1.4.5. Inmovilización de la ureasa

La ureasa es una de las enzimas que ha sido inmovilizada por mayor número de métodos debido a su uso analítico en la determinación de urea, su especificidad y su estabilidad. En esta diversidad de métodos están incluidos tanto métodos físicos, químicos como híbridos.

Uno de los primeros métodos de inmovilización de ureasa fue la adsorción de la enzima en kaolinita, publicado por Sundaraman y Crook (42). En éste, se adiciona la ureasa al soporte sólido en una proporción de 33 mg proteína/g soporte, en una disolución de Tris-KCl-EDTA. Los autores reportan que el pH óptimo de la enzima inmovilizada es el mismo que el de la ureasa en disolución, mientras que los parámetros cinéticos mostraban algunos cambios. La velocidad máxima es consistentemente mayor para la enzima inmovilizada, mientras que la constante de Michaelis-Menten aparente es ligeramente mayor.

Gardner, Falb, Kim y Emmerling utilizaron un método híbrido para inmovilizar la ureasa, en el cual, la enzima se adsorbe en sílice fundida y posteriormente se entrecruza con glutaraldehído (43). La concentración de glutaraldehído utilizada y el tiempo de incubación para el entrecruzamiento son parámetros críticos para obtener altos rendimientos en la actividad de la enzima. Reportaron de 80-90% de retención de la enzima sin pérdida de ésta después de 39 días almacenada a 22°C.

Un gran número de autores han utilizado los métodos de atrapamiento en gel, principalmente para la construcción de sensores electroquímicos para mediciones de urea (44, 45). Gilbault y Das realizaron un estudio comparativo de inmovilización de

ureasa por atrapamiento en gel en diferentes matrices (46). De las matrices estudiadas, la de gel de almidón retiene la mayor actividad con un 100% de rendimiento, contra un 80% de retención en gel de poliacrilamida y 20% en goma de silicón. En contraste con el rendimiento en el proceso de atrapamiento, la pérdida de la actividad enzimática después de haber pasado 20 ml de disolución es de 25% para gel de almidón y 4% para gel de poliacrilamida. En ambos tipos de gel la enzima tiene excelente estabilidad de almacenamiento y su actividad se mantiene constante después de 90 días de almacenamiento a 4°C.

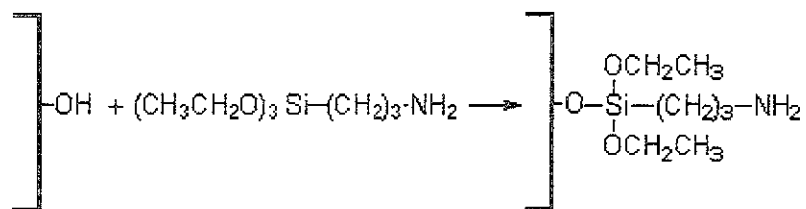
Riesel y Katchalski realizaron un estudio de la actividad de la ureasa inmovilizada por unión química con copolímeros diazotizados de *p*-amino-DL-fenilalanina y L-alanina, L-glicina o L-leucina (47). En este estudio se observa, entre otras cosas, que en el polímero que contiene glicina, la enzima tiene una actividad significativamente menor a la de las demás preparaciones, a pesar de que la cantidad de enzima unida al polímero es comparable.

Un método de inmovilización de la ureasa de especial interés para analizadores de flujo continuo es el reportado por Inman y Hornby (48). La ureasa se une por medio de una unión covalente a la superficie interior de un tubo de nylon. El nylon se hidroliza parcialmente con HCl y posteriormente se derivatiza con glutaraldehído. Con la enzima así preparada se pueden realizar más de 5000 análisis, en un período de 30 días sin tener pérdida de actividad. En un trabajo posterior, Anita y col. (49), utilizando el mismo método de inmovilización en nylon, estudiaron el efecto del pH, concentración de la ureasa y tiempo de incubación, así como las propiedades de la enzima inmovilizada.

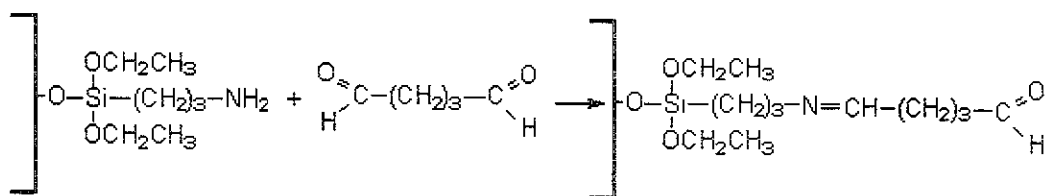
En cuanto a la inmovilización de la ureasa en vidrio de poro controlado (CPG por sus siglas en inglés), se encontraron diversas técnicas reportadas. Weetall y Hersh utilizaron la técnica de formación de sal de diazonio. El CPG (790 ± 50 Å, malla 100) se pone a reflujo en una disolución de γ -aminopropiltriétoxissilano. El grupo aminoalquil se convierte en aminoaril por reacción con ácido *p*-nitrobenzoico, posteriormente éste es reducido, diazotizado y adicionado a la disolución de ureasa. Se obtienen 1150 I.U./g CPG (50).

El método de inmovilización en CPG descrito por Masoom y Townshend (51) ha sido muy empleado en las técnicas de Análisis por Inyección en Flujo. Este método se puede dividir en tres pasos:

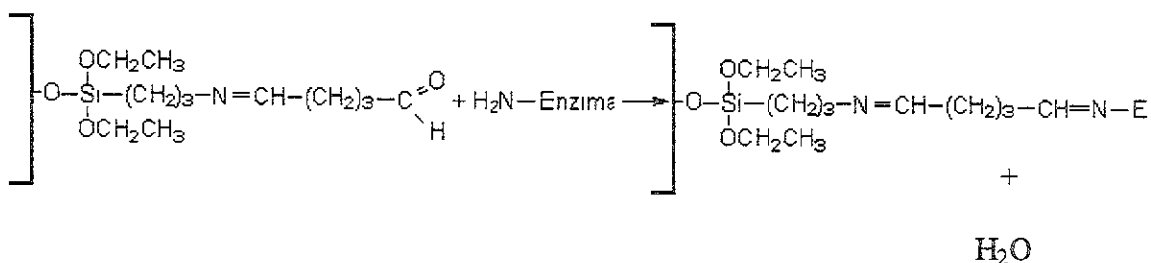
1. Preparación del aminopropil derivado por tratamiento del CPG con 3-aminopropil trietoxisilano



2. Acoplamiento con glutaraldehído



3. Inmovilización de la enzima



Gilbault y Montalvo (52) diseñaron un electrodo específico para urea, inmovilizando la ureasa en una película de gel de acrilamida (60-350 μm) en la superficie de un electrodo selectivo de amonio. Cuando el electrodo de ureasa se pone

en contacto con una disolución de urea, el sustrato difunde a través de la película de enzima inmovilizada, se produce la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa, y el amonio producido es detectado por el electrodo. Tres décadas después, Eremeev y Kikhtin (53) inmovilizaron la ureasa en gel de poli-N-isopropilacrilamida y estudiaron la relación entre la actividad de la enzima y las propiedades de hinchamiento de la matriz termosensible.

La ureasa ha sido también utilizada "inmovilizada naturalmente". Mark A. Arnold y Scott A. Glazier (54) describen la construcción de un biosensor de urea. Para ello se forma una pasta uniforme sobre la superficie de un electrodo selectivo de amonio con semillas de ejote pulverizado, disolución amortiguadora y glutaraldehído. Este método de inmovilización en la membrana del electrodo es muy similar al descrito por M. Mascini y G.G. Guilbault (55), con la diferencia que estos autores utilizaron una disolución de enzima purificada.

Faria y col. propusieron un método de determinación de urea en suero utilizando ureasa también "inmovilizada naturalmente" en un sistema de inyección en flujo con detector conductimétrico (56). En la configuración propuesta por estos autores utilizaron una columna empacada con pequeños trozos de semilla de ejote.

En cuanto a inmovilización de ureasa en membranas de polímeros, Godjevargova y Dimov (57) describieron un método de inmovilización de ureasa en membrana de copolímero de acrilonitrilo (AN). Debido a que este copolímero no tiene grupos activos necesarios para la inmovilización de la enzima, modificaron el copolímero AN con 2-dimetilaminoetil metacrilato (DMAEM) y ácido diacrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPSA). Estudiaron las propiedades de la ureasa inmovilizada (estabilidad térmica, temperatura y pH óptimos) encontrando que el pH óptimo de la ureasa unida a membranas modificadas con AMPSA es ligeramente mayor al de la ureasa en disolución (7 a 7.5), mientras que al utilizar DMAEM el desplazamiento es hacia pH menores (7 a 6). La temperatura y estabilidad térmica son mayores en los sistemas de ureasa inmovilizada que en disolución.

En 1995, Koncki, Mohr y Wolfbeis (58) describieron un biosensor para urea incorporando un colorante (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, EDC) con

propiedades ácido-base a una membrana de cloruro de polivinilo carboxilado (PVC-COOH). La ureasa se inmoviliza por unión covalente a la membrana y ésta se coloca dentro de una celda de flujo, de manera que cuando pasa la disolución de urea por la celda de flujo, la reacción enzimática provoca un cambio en el pH y por lo tanto en la absorbancia del EDC. Las mediciones se realizan a 684 nm, que es la λ_{\max} de la forma ácida del colorante.

Nilanjana Das y col. (59) reportan la construcción de un sensor utilizando un electrodo de vidrio y ureasa inmovilizada por el método de atrapamiento en micelas inversas formadas por dodecil sulfato de sodio en *n*-hexano. Debido a que la inmovilización de la ureasa es uno de los pasos cruciales en la fabricación del biosensor, los autores evaluaron primeramente la actividad de la enzima inmovilizada y la compararon contra la actividad de la misma en disolución, encontrando que hay alrededor de 3 veces de aumento de actividad en la enzima inmovilizada, y que a los cinco días la actividad de la enzima inmovilizada se mantenía estable, mientras que para la enzima en disolución la actividad comenzaba a decaer al segundo día. El biosensor fue probado en muestras de concentración conocida y muestras biológicas.

1.4.6. Determinación de urea

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la determinación de urea, muchos de ellos basados en la hidrólisis enzimática utilizando la ureasa, en donde uno o los dos productos de la reacción enzimática son monitoreados. Dentro de estos métodos, algunos han sido diseñados de manera general, mientras que otros han sido diseñados para la resolución de problemas específicos (52, 60).

De especial interés para el presente trabajo son los métodos para la determinación enzimática de urea integrados a una configuración FIA, en donde generalmente el ion amonio es detectado.

Entre los detectores electroquímicos más utilizados para la determinación enzimática de urea se encuentra el electrodo selectivo. En las configuraciones FIA más sencillas, la urea es inyectada en un portador que contiene la enzima disuelta. El

cambio en el pH provocado por la reacción enzimática es detectado por un electrodo de pH (61).

Johansson y Ögren (62) describieron un método de determinación de urea por FIA utilizando un electrodo de amoníaco. En esta configuración, integran un reactor empacado con ureasa inmovilizada antes del detector, a diferencia de otros autores que inmovilizan la ureasa en la superficie de un electrodo selectivo de ion amonio (44, 45, 54, 55). Otros detectores electroquímicos utilizados en configuraciones FIA son los detectores conductimétricos (56, 63) y coulométricos (64).

Uchiyama y col. utilizan un reactor empacado con ureasa inmovilizada en CPG para la determinación simultánea de urea, sodio, potasio y amonio en orina humana y fertilizantes químicos por cromatografía de iones con detector de conductividad (65).

Para la determinación espectrofotométrica de urea, puede utilizarse la ureasa como disolución portadora e incorporar los reactivos necesarios para la reacción de derivatización (4) o bien utilizando un reactor con urea inmovilizada, como lo describen Solich y col. (66).

CAPÍTULO 2

REACCIONES ENZIMÁTICAS EN ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

2.1. GENERALIDADES

La combinación de la técnica de inyección en flujo descrita por Ruzicka y Hansen (3) con los métodos enzimáticos de análisis puede producir soluciones útiles para un gran número de problemas, pues resulta muy ventajoso aprovechar la velocidad y simplicidad del Análisis por Inyección en Flujo (FIA) con la selectividad de los métodos enzimáticos.

Las enzimas en FIA pueden utilizarse de tres formas: como catalizadores, en la determinación de una gran variedad de sustratos en una amplia diversidad de muestras reales (67, 68, 69); para la determinación de actividades enzimáticas (70, 71) y, la menos común, es utilizando pre-reactores con enzimas inmovilizadas para eliminar interferencias (72).

Existen dos maneras generales de utilizar las enzimas en FIA:

1. Enzimas en disolución.
2. Enzimas inmovilizadas.

La figura 2.1. muestra las alternativas para el uso de enzimas en disolución: (A) Por aspiración, como disolución portadora o para converger con el flujo portador. (B) Inyectadas en la disolución portadora que contiene o a la que confluye el sustrato, en una configuración de FIA inverso (73). (C) Por administración continua en la celda de flujo a través de una membrana permeable.

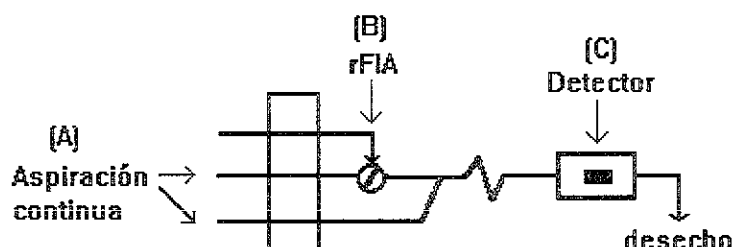


Fig. 2.1. Alternativas para el uso de enzimas en disolución en configuraciones FIA.

Las enzimas inmovilizadas tradicionalmente se utilizan en reactores empacados a través de los cuales pasa el sustrato. Estos reactores empacados pueden ser insertados tanto en el bucle de la válvula de inyección (74, 75) como en el sistema de transporte. Las enzimas pueden ser también inmovilizadas en la celda de flujo en el detector (76) (Figura 2.2.) para ser utilizadas en detecciones potenciométricas, quimioluminiscentes (77, 78, 79), reflectancia (80, 81), fluorescencia (82) o espectrofotométricas (83).

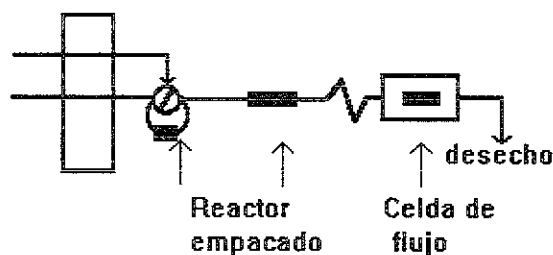


Fig. 2.2. Alternativas de uso de enzimas inmovilizadas en una configuración FIA.

La incorporación de enzimas en configuraciones FIA ha representado un gran avance en el diseño de metodologías analíticas. La resolución de problemas analíticos más complejos ha sido posible al utilizar las enzimas en configuraciones FIA a su vez más complejas, tales como los sistemas acoplados HPLC/FIA, en donde pueden tenerse dos configuraciones generales:

- a) Arreglos pre-columna, en los cuales, la inyección para el sistema FIA tiene lugar antes de la inyección cromatográfica.
- b) Arreglos post-columna, en los cuales, la inyección FIA tiene lugar después del proceso cromatográfico.

Sistemas acoplados HPLC/FIA han sido utilizados para análisis clínicos de rutina. Tal es el caso del análisis de ácidos biliares en suero. Los niveles normales de ácidos biliares totales se encuentran abajo de 1 mg/L, por lo tanto,

concentraciones arriba de ésta indican que existe alguna enfermedad en el hígado. Por otra parte, la relación entre las concentraciones de los diferentes ácidos biliares son indicativos de padecimientos específicos, tales como cirrosis, ictericia o colesterosis. Es por tanto necesario tener la posibilidad de analizar las muestras por medio del sistema FIA, a fin de seleccionar aquellas que contienen ácidos biliares en niveles superiores a 1 ppm; solamente estas muestras son analizadas por HPLC (84).

2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR FIA

Los diferentes tipos de configuraciones FIA utilizadas para la determinación de la actividad enzimática pueden ser:

1. Flujo detenido.
2. Sistemas abierto-cerrado.

2.2.1. Configuraciones en flujo detenido

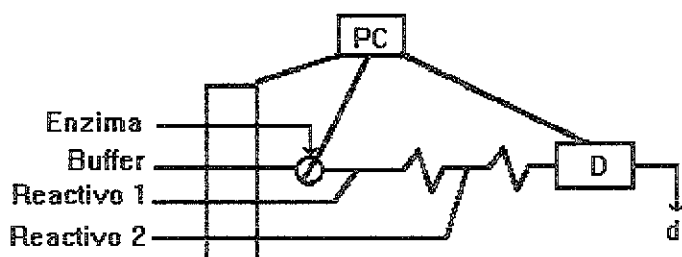
El detener el flujo en una configuración FIA puede tener dos objetivos diferentes:

1. Incrementar la sensibilidad por un aumento del tiempo de reacción. En este caso, el flujo se detiene mientras el bolo inyectado se encuentra en el reactor.
2. Realizar medidas del comportamiento cinético, deteniendo el flujo cuando el bolo inyectado se encuentra en la celda de flujo de un detector no destructivo.

Desde el punto de vista técnico, existen muchas configuraciones FIA posibles para implementar metodologías de flujo detenido, que van desde las configuraciones simples hasta configuraciones que involucran doble flujo detenido o sistemas acoplados HPLC/FIA (85). Dependiendo de la complejidad de la configuración, se puede requerir el uso de una computadora que sincronice el tiempo en el que se efectúe la inyección con el momento en el que se detiene el flujo.

La figura 2.3. (A) muestra una configuración simple de flujo detenido para la determinación de la actividad enzimática. La enzima disuelta se inyecta en la disolución amortiguadora que posteriormente converge con las disoluciones que contienen al sustrato y los reactivos necesarios para la determinación. El flujo se detiene cuando el bolo de muestra llega a un detector y se registran los incrementos de la señal en función del tiempo (Figura 2.3. (B)).

(A)



(B)

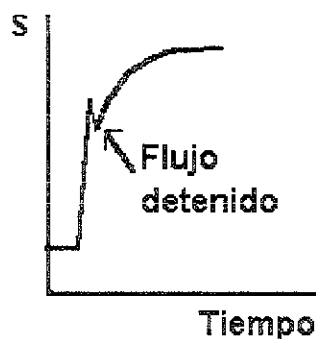


Fig. 2.3. (A) Configuración simple de flujo detenido. (B) Señal obtenida.

Las determinaciones que involucran tiempos de reacción relativamente grandes, requieren que se detenga el flujo cuando el bolo de muestra está en el reactor, a fin de incrementar la cantidad de producto de la reacción. Esto tiene como consecuencia un decremento significativo en la frecuencia de inyección de la muestra, y por consiguiente, un mayor tiempo de análisis. El uso de una válvula de distribución automática (V.D.A.) y cuatro reactores en paralelo permite optimizar la frecuencia de inyecciones, ya que, mientras el cuarto reactor se está

llenando, en los otros tres ya se encuentra la muestra previamente inyectada. Esta configuración, mostrada en la figura 2.4., fue aplicada por Rocks y Riley para la determinación de fosfatasa ácido prostática en suero humano, basada en el uso de α -naftil fosfato como sustrato y la formación de un colorante diazo (86).

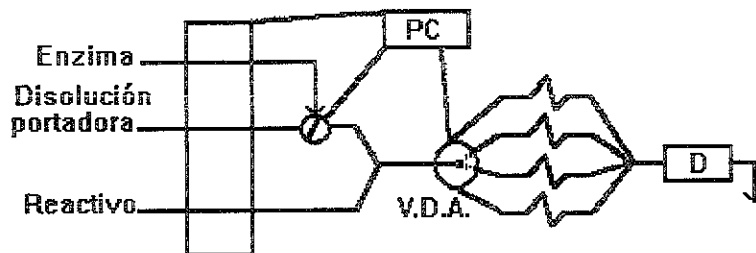


Fig. 2.4. Configuración multicanal con flujo detenido.

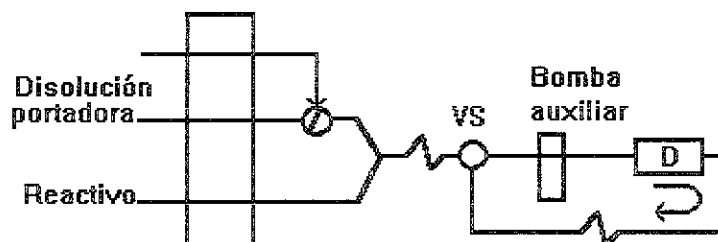
2.2.2. Sistema abierto-cerrado

En las configuraciones abierto-cerrado, la muestra se inyecta en la disolución portadora, y después confluye con los reactivos necesarios para realizar la detección. Una vez que el bolo de muestra ha pasado a través de la celda de flujo del detector, la válvula de selección (V.S.) se coloca en posición de cerrado, de esta manera el bolo de muestra queda atrapado dentro de un circuito, pasando, con ayuda de la bomba auxiliar, de manera iterativa a través de la celda del detector. Se obtienen entonces una serie de picos que incrementan su altura a medida que la reacción enzimática continúa desarrollándose (Figura 2.5.).

Cabe hacer notar que en este tipo de configuraciones puede utilizarse la enzima en disolución, ya sea inyectada o aspirada, o bien, incluir un reactor enzimático en el circuito abierto-cerrado.

Con este tipo de configuración se han desarrollado diversas metodologías para la determinación de actividades enzimáticas (87, 88) así como en sistemas acoplados HPLC/FIA (89).

(A)



(B)

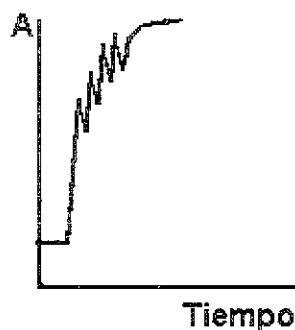
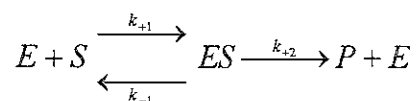


Fig. 2.5. (A) Configuración abierto-cerrado. (B) Señal obtenida.

2.3. VELOCIDAD DE REACCIÓN EN REACTORES ENZIMÁTICOS

Como ya se discutió en el capítulo anterior, el equilibrio de Michaelis-Menten



expresa el mecanismo por medio del cual el sustrato S se une reversiblemente a la enzima E, para formar el complejo enzima-sustrato, ES, el cual se descompone irreversiblemente en el producto P y la enzima. La expresión de velocidad para esta reacción es

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad (2.1.)$$

Si $[S] \ll K_M$ la ecuación (2.1.) se simplifica en una expresión de primer orden con respecto a la concentración de sustrato.

Muchas enzimas muestran un esquema de reacción mucho más complicado que el mecanismo simple de Michaelis-Menten, sin embargo, en el presente trabajo se utilizó la enzima ureasa, en la cual, el equilibrio de Michaelis-Menten describe de manera adecuada su funcionamiento. A continuación se presenta un análisis de la cinética de reacción en reactores, tomando en consideración básicamente dos tipos de reactores. El primero de ellos, el más simple, se refiere a un tubo recto abierto y considera que la enzima se encuentra en disolución (20); el segundo considerará efectos de transferencia de masa internos y externos (90).

2.3.1. Tubo recto abierto

La fig. 2.6. muestra el balance de masa en un reactor de flujo considerado como un tubo recto abierto.

$$\left. \frac{\text{moles}}{\text{seg}} \right|_{\text{entra}} = F * [S]_l \qquad \left. \frac{\text{moles}}{\text{seg}} \right|_{\text{sale}} = F * [S]_{l+\delta l}$$

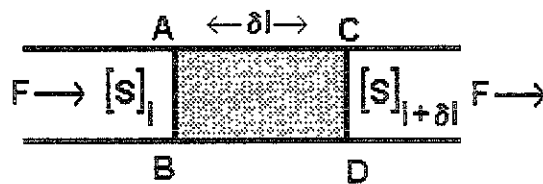


Fig. 2.6. Balance de masa en un reactor de flujo. Tubo recto abierto.

El sustrato se convierte a producto a una velocidad v (moles/ml seg). La velocidad neta de la reacción química en el segmento ABCD es $v\partial V$, en donde ∂V es el volúmen del fluido contenido en el reactor, y será igual a

$$\partial V = \alpha_v \delta l \quad (2.2.)$$

y α_v es el área de la sección transversal.

La velocidad de acumulación del sustrato (moles/seg), que es igual a la velocidad de cambio de la concentración del sustrato en el elemento ABCD está dada por:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} * \partial V = F[S]_l - F[S]_{l+\partial l} - v\partial V \quad (2.3.)$$

velocidad de acumulación (moles/seg) = flujo que entra - flujo que sale - término de producción por reacción química

sustituyendo (2.2.) en (2.3.) y resolviendo el límite, cuando $\partial l \rightarrow 0$

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = -\frac{F}{a_v} \frac{\partial[S]}{\partial l} - v \quad (2.4.)$$

que es la ecuación fundamental para este tipo de reactores.

Tomando en cuenta que el término F/a_v es la velocidad lineal promedio (u), entonces la ecuación (2.4.) se puede escribir como

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} + u \frac{\partial[S]}{\partial l} + v = 0 \quad (2.5.)$$

en el estado de equilibrio, esto es, cuando la concentración del sustrato es constante y $\partial[S]/\partial t = 0$, entonces

$$u \frac{d[S]}{dl} = -v \quad (2.6.)$$

$$ud[S] = -vdl \quad (2.7.)$$

Para la cinética de Michaelis-Menten, sustituyendo (2.1.) en (2.7.)

$$ud[S] = -\frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} dl \quad (2.8.)$$

rearrreglando términos y resolviendo las integrales correspondientes se obtiene

$$uK_M \ln \frac{[S]_L}{[S]_0} + u([S]_L - [S]_0) = -k_2[E]_0 L \quad (2.9.)$$

o bien

$$K_M \ln \frac{[S]_L}{[S]_0} + k_2[E]_0 \frac{L}{u} = [S]_0 X \quad (2.10.)$$

en donde X es la fracción de sustrato convertida

$$X = \frac{[S]_0 - [S]_L}{[S]_0} \quad (2.11.)$$

Rearreglando la ecuación (2.10.)

$$[S]_0 X = K_M \ln(1 - X) + k_2 [E]_0 \frac{L}{u} \quad (2.12)$$

y sustituyendo la relación

$$\tau = \frac{L}{u} \quad (2.13.)$$

en donde τ es el tiempo de residencia, se obtiene

$$[S]_0 X = K_M \ln(1 - X) + k_2 [E]_0 \tau \quad (2.14.)$$

La ecuación 2.14. relaciona los dos parámetros más importantes en el diseño de reactores analíticos, que son la fracción de sustrato convertida y el tiempo de residencia, el cual está relacionado con la dispersión.

2.3.2. Reactores empacados

La concentración efectiva de sustrato en reactores con resistencia a la transferencia de masa es menor en el sitio activo que cuando la reacción enzimática se lleva a cabo en un tanque (91). Por lo tanto, la ecuación (2.1.), para un reactor empacado con la enzima inmovilizada en un soporte sólido, puede representarse como una expresión de primer orden, inclusive a concentraciones de sustrato en disolución arriba de K_M

$$-\frac{d[S]}{dt} = K_{ps}^{ap} [S] \quad (2.15.)$$

en donde K_{ps}^{ap} es la constante de velocidad aparente:

$$K_{ps}^{ap} = \frac{(V_0)_{\max}}{K_M} \quad (2.16.)$$

Integrando la ecuación (2.15) entre los límites S_0 , S_L , que son las concentraciones de sustrato a la entrada y la salida del reactor respectivamente, y t_0 , t , o tiempo de residencia τ , se obtiene

$$-\ln \frac{[S]_L}{[S]_0} = K_{ps}^{ap} \tau \quad (2.17.)$$

Expresando la ecuación (2.17.) en términos de fracción de sustrato convertido:

$$-\ln(1 - X) = K_{ps}^{ap} \tau \quad (2.18.)$$

Debido a la reacción química, hay una disminución de la concentración de sustrato tanto alrededor como dentro del soporte sólido. En el límite, cuando la catálisis es más eficiente, la reacción se lleva a cabo de manera más completa en la superficie que en el interior del soporte sólido. Es conveniente entonces expresar la utilización de la enzima en términos del factor de efectividad η_t

η_t = velocidad con transferencia de masa finita/velocidad con transferencia de masa infinita

El factor de efectividad η_t puede a su vez dividirse en factores de efectividad por transferencia de masa externa, η_e , e interna, η_i

$$\eta_e + \eta_i = \eta_t \quad (2.19.)$$

Estos factores de efectividad están dados también por la relación de velocidades con transferencia de masa finita e infinita, que para una cinética de primer orden es igual a la relación de las velocidades de reacción

$$\eta_e = \frac{K_{ps}^{ap}}{K_{ps}} \quad (2.20.)$$

$$\eta_i = \frac{K_{ps}}{K} \quad (2.21.)$$

en donde K_{ps} es la constante de velocidad en ausencia de limitaciones por transferencia de masa externa y K es la constante de velocidad en ausencia de toda resistencia a la transferencia de masa.

La transferencia de masa tanto externa como interna dependerá del flujo y la geometría del soporte sólido (diámetro de partícula, porosidad, superficie externa, difusividad efectiva en los poros, etc.), por lo que no es posible establecer un modelo matemático general para reactores con resistencia a la transferencia de masa y cinética de Michaelis-Menten.

Un reactor con resistencia a la transferencia de masa apreciable muestra una constante aparente de Michaelis-Menten mayor a medida que esta resistencia a la transferencia de masa se incrementa. La validez de la aproximación de primer orden de la ecuación (2.1.) dependerá entonces del diseño del reactor, pero la ecuación de Michaelis-Menten podrá ser utilizada tarde o temprano a medida de que la concentración inicial de sustrato aumenta.

Un reactor que opere con una cinética de orden cero ($[S]_0 \gg K_M^{ap}$) es obviamente inútil desde el punto de vista analítico, ya que la cantidad del producto es independiente de la concentración inicial de sustrato.

En el sistema descrito anteriormente se ha considerado un flujo mecánico muy simple, sin tomar en cuenta el efecto del empacado de la columna, en donde se tienen complicaciones adicionales a considerar, las más importantes, la difusión de eddy y la resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil, (92, 93) además del efecto del diámetro de la columna y la resistencia difusional a la transferencia de masa. (94, 95)

2.3.3. Inhibición en reactores enzimáticos

La inhibición de enzimas ha sido utilizada para la determinación de diversos metales (inhibidores de la reacción enzimática) al ser la concentración de estos proporcional a la cantidad de enzima inhibida.

Ignorando la presencia de empacado, retomando la ecuación (2.9.)

$$uK_M \ln \frac{[S]_L}{[S]_0} + u([S]_L - [S]_0) = -k_2[E]_0 L$$

sustituyendo

$$u = \frac{F}{a_v}$$

y tomando en cuenta que

$$[S]_L = [S]_0 - [P]$$

se obtiene:

$$k_2[E]_0 L \frac{a_v}{F} = [P] + K_M \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]} \quad (2.22)$$

La cantidad $[E]_0 a_v L$ da el contenido de enzima activa en el reactor. Si se introduce un inhibidor y éste se une a una parte de la enzima, solamente la cantidad $([E]_0 - [E]_I) a_v L$ de la enzima permanece activa. La cantidad de enzima inhibida $[E]_I a_v L$ es proporcional a la concentración del inhibidor.

Si se miden la cantidad de producto antes de la inhibición $[P]_E$ y después de la inhibición $[P]_I$, se puede encontrar la cantidad de enzima inhibida

$$[[E]_0 a_v L - ([E]_0 - [E]_I) a_v L] \frac{k_2}{F} = [P]_E - [P]_I + K_M \ln \frac{[S]_0 - [P]_I}{[S]_0 - [P]_E} \quad (2.23)$$

Definiendo ahora la efectividad como la relación entre la concentración de producto y la concentración inicial del sustrato

$$\eta = \frac{[P]}{[S]_0} \quad (2.24)$$

se obtiene

$$[E]_I a_v L = \frac{[S]_0 F}{k_2} \left[(\eta_E - \eta_I) + \frac{K_M}{[S]_0} \ln \left(\frac{1 - \eta_I}{1 - \eta_E} \right) \right] \quad (2.25)$$

Para valores pequeños de efectividad, la ecuación (2.25) se puede expandir en serie

$$[E]_I \alpha_v L = \frac{[S]_0 F}{k_2} (\eta_E - \eta_I) \left[1 + \frac{K_M}{[S]_0} + \frac{K_M (\eta_E + \eta_I)}{2 [S]_0} + \dots + \right] \quad (2.26)$$

Para valores grandes de $[S]_0$, o sea $[S]_0 \gg [P]$ y $[S]_0 > K_M$ la cantidad de enzima inhibida, y por lo tanto, la concentración del inhibidor, es proporcional a $(\eta_E - \eta_I)$.

En estas condiciones, es factible realizar determinaciones analíticas empleando sistemas de inhibición enzimática. Para ello es necesario optimizar el tamaño del reactor enzimático que se utilizará en el sistema de flujo. Un reactor enzimático grande se traducirá en poca sensibilidad en la medición, mientras que un reactor enzimático pequeño dará intervalos cortos de concentración de inhibidor en el cual sea posible realizar la determinación.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental del presente estudio puede dividirse fundamentalmente en dos partes:

I. Inmovilización de la ureasa, que involucra tanto las técnicas de inmovilización como la evaluación misma de dichas técnicas de inmovilización, a partir de su aplicación como método de cuantificación de urea y de la determinación de la actividad enzimática de la ureasa.

II. Viabilidad de la determinación de mercurio por inhibición de ureasa, que comprende la optimización de tiempos de inhibición, teniendo un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis y la optimización del método de regeneración de la enzima.

Reactivos:

1) Reacción de cuantificación:

Disolución de ácido hipocloroso. A 40 ml de agua se agregan 10 ml de hipoclorito de sodio 5%. Se ajusta el pH entre 6.5 y 7 con ácido clorhídrico.

Disolución de fenolato. Se disuelven 2.5 g de hidróxido de sodio y 10 g de fenol en 100 ml de agua libre de amonio.

Disolución madre de amonio. Se prepara una disolución madre de amonio de concentración aproximadamente 10 mM.

Disoluciones patrón de amonio. Se preparan disoluciones patrón para la curva de calibración en un intervalo de concentraciones entre 0.1 y 5 mM.

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.

Ureasa 16.9 UI/ml. A partir de enzima ureasa Tipo III de Jack Bean EC 3.5.1.5.(Sigma 31000 UI/g).

Disolución madre de urea. Se prepara una disolución madre de urea de concentración aproximada 10 mM en buffer fosfatos.

Disoluciones patrón de urea. Se preparan disoluciones patrón para la curva de calibración en un intervalo de concentraciones entre 0.06 y 5 mM.

2) Inmovilización de la ureasa en alginato:

Alginato de sodio.

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.

Disolución de cloruro de calcio 50 mM en buffer fosfatos 0.05 M.

Enzima ureasa Tipo III de Jack Bean EC 3.5.1.5.(Sigma 31000 UI/g)

3) Inmovilización de ureasa en CPG:

Disolución de ácido nítrico 5%.

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.

3-aminopropil trietoxi silano (Aldrich Chemical Company) 2.5 ml de 3-aminopropil trietoxi silano se disuelven en 45 ml de disolución amortiguadora ácido acético / acetato 0.05 M pH 5.0.

Glutaraldehído (Aldrich Chemical Company). Disolución de glutaraldehído al 12% en amortiguador pirofosfato 0.1 M pH 8.5.

Enzima ureasa Tipo III de Jack Bean EC 3.5.1.5.(Sigma 31000 UI/g).

Vidrio de poro controlado malla 120-200, diámetro de poro 242 Å (CPG Sigma PG 240-200)

4) Determinación de mercurio:

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.

Disolución de ácido hipocloroso.

Disolución de fenolato.

Disolución de urea 4 y 2.5 mM.

Disolución regeneradora: EDTA 10 mM

Instrumentación:

Se utilizó una bomba peristáltica con cabeza de ocho canales marca Gilson Minipuls 3. Válvula de inyección de 4 pasos marca Rheodyne. Espectrofotómetro UV-Visible marca Varian modelo Cary 1.

Para el sistema de transporte-reacción se utilizó tubo capilar de teflón de 1/16" D.E. x 0.5 mm D.I. Tuercas Deldrin para conexión 1/16" sin bordo. Férulas TEFZEL para conexión 1/16" sin bordo. Uniones simples y en T de polipropileno. Celdas de flujo de cuarzo de 1 cm y de vidrio de 0.1 cm de paso óptico.

3.1. INMOVILIZACIÓN DE LA UREASA

3.1.1. Inmovilización en alginato

PROCEDIMIENTO

Se preparó una disolución de ureasa disolviendo 0.0545 g de proteína en 100 ml de la disolución de fosfatos. La actividad de la disolución resultante es de 16.9 UI/ml.

Se disolvió 1 gramo de alginato de sodio en 30 ml de buffer fosfatos. La disolución se deaireó y se agregó 1 ml de la disolución de ureasa. Esta disolución se hizo pasar a través de una jeringa con aguja de 0.3 mm goteando en una disolución de CaCl_2 50 mM para formar esferas uniformes de enzima-alginato.

Las esferas de enzima-alginato se filtraron y lavaron primero con la disolución amortiguadora de fosfatos fría, después con agua fría y por último se secaron a temperatura ambiente guardándose refrigeradas a 4°C hasta que se utilizaron.

3.1.2. Inmovilización en vidrio de poro controlado (CPG)

Se utilizó el método de inmovilización en CPG descrito por Masoom y Townshend (51).

PROCEDIMIENTO

Limpieza del vidrio

A 2 g de vidrio de poro controlado se les agregaron 20 ml de ácido nítrico 5%, se calentaron manteniendo la ebullición durante 30 minutos. Posteriormente se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado, se lavó con agua desionizada y se secaron a 95°C durante 2 horas.

Activación del vidrio

a) Silanización

Se preparó la disolución del silanizante con 5 ml de 3 aminopropil trietoxi silano y 45 ml de disolución amortiguadora acético/acetato 0.05 M (pH 5). A esta disolución se añadió el CPG seco y se mantuvo a una temperatura de 90°C durante dos horas, agitando a intervalos de 15 minutos.

El CPG-alquilaminado se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado, se lavó con agua desionizada y se secó a 95°C durante 2 horas.

b) Acoplamiento con glutaraldehído

Se preparó una disolución de glutaraldehído al 12% en amortiguador pirofosfato 0.1 M (pH 8.5). El CPG-alquilaminado se agregó a esta disolución y se mantuvo con agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. El CPG activado se lavó con agua desionizada y se secó al vacío.

Inmovilización de la enzima

Se preparó una disolución de ureasa disolviendo 0.0545 g de proteína en 100 ml de disolución amortiguadora de fosfatos. La actividad de la disolución resultante es 16.9 UI/ml. Se agregaron 2 ml de esta disolución a 0.1 g de CPG activado en un vial cerrado, se mantuvo a 4°C durante 6 horas, agitando el vial cada 30 minutos. Después de este tiempo, el CPG se filtró, se lavó primero con agua fría y después con disolución amortiguadora de fosfatos.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA

Para la evaluación de la ureasa se realizó la determinación de amonio (producto de la reacción enzimática), la determinación de urea y la determinación de la actividad enzimática utilizando la ureasa en disolución, inmovilizada en alginato e inmovilizada en CPG.

La determinación de amonio se realizó en cada uno de los sistemas con dos finalidades:

- a) Comparar las determinaciones de amonio y urea, teniendo para los dos analitos las mismas condiciones hidrodinámicas.
- b) Referir los resultados de las mediciones cinéticas a concentración de amonio producido por la reacción enzimática.

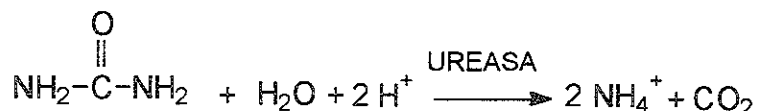
Para evaluar la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima se utilizó la transposición propuesta por Lineweaver y Burke (ec. 1.3.) y la de Hofstee y Eadie (ec. 1.4.).

Los cálculos de velocidad se realizaron en base al incremento de concentración de amonio (producto de la reacción enzimática) por unidad de tiempo.

3.2.1. Ureasa en disolución

3.2.1.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO POR FIA

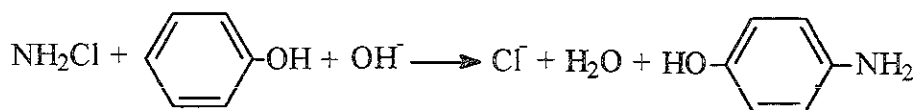
La enzima ureasa, como se indicó en la sección 1.4.2, cataliza la hidrólisis de la urea según la reacción:

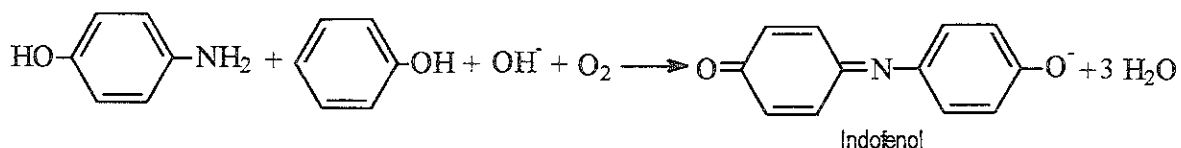


En el presente estudio, todas las determinaciones que involucren la acción de la enzima ureasa se realizaron indirectamente midiendo la cantidad de amonio producido por la reacción enzimática; por esta razón, se propuso la metodología y se optimizaron tanto las variables químicas como las variables FIA para la determinación de amonio.

La determinación de amonio se basa en la reacción de Berthelot, en la cual éste reacciona con hipoclorito de sodio y fenolato para formar el indofenol, compuesto azul intenso que presenta una λ_{max} a 620 nm y cuya concentración es proporcional a la concentración inicial de amonio (96).

El mecanismo de la reacción de Berthelot es complejo, pero puede resumirse como sigue (97):





PROCEDIMIENTO

Se pesaron 274.4 mg de cloruro de amonio y se aforaron a 500 ml con agua desionizada. La concentración de la disolución resultante es 10.26 mM. A partir de ésta, se prepararon los patrones en concentraciones entre 0.1 y 5.13 mM.

Utilizando la disolución de concentración 0.41 mM se optimizaron las variables químicas (concentraciones de hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y fenol) y las variables FIA (flujo de la disolución portadora, volúmen de inyección y longitudes de los reactores).

La figura 3.1. muestra la configuración utilizada para la determinación de amonio.

120 µl de la disolución de amonio se inyectan en la disolución portadora (agua) y confluye primero con la disolución de ácido hipocloroso y posteriormente con la disolución de fenolato. La formación del indofenol ocurre en el reactor L2 y pasa a través de la celda de flujo del detector produciendo un aumento en el valor de absorbancia medida a 620 nm.

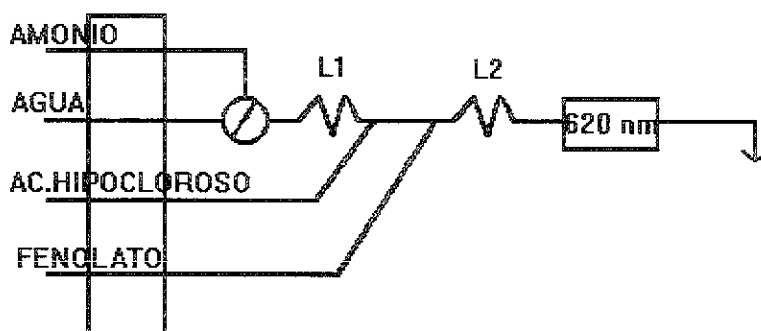


Fig. 3.1. Configuración para la determinación de amonio.

3.2.1.2. DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE UREA

PROCEDIMIENTO

75.07 mg de urea se disolvieron en 100 ml de agua desionizada. La concentración de urea en la disolución resultante es 12.5 mM. A partir de esta disolución se prepararon los patrones para la curva de calibración en concentraciones entre 0.06 y 5 mM.

La figura 3.2. muestra la configuración utilizada para la determinación de urea utilizando la enzima ureasa en disolución.

120 μ l de la disolución de urea se inyectan en la disolución portadora, que en este caso es la disolución de ureasa en fosfatos; por esta razón, la reacción enzimática comienza a ocurrir desde el momento de la inyección. El amonio resultante se determina por la formación del indofenol. La velocidad de flujo, volúmen de inyección, longitudes de los reactores, así como las concentraciones de ácido hipocloroso y fenolato utilizadas que se utilizaron fueron las que resultaron de la optimización para la determinación de amonio.

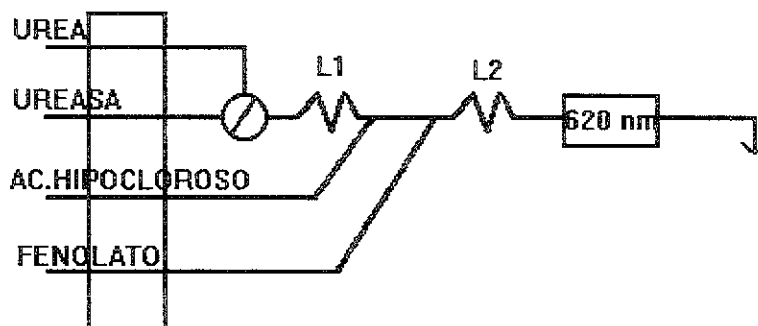


Fig. 3.2. Configuración para la determinación de urea. Ureasa en disolución.

3.2.1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA

Debido a las características de las matrices sólidas en las que se inmovilizó la ureasa, alginato y CPG, la determinación de la actividad enzimática

de la ureasa inmovilizada se determinó por configuración abierto-cerrado para el primero y por flujo detenido para el segundo. Por esta razón, y con el fin de poder comparar los resultados, la actividad enzimática de la ureasa en disolución se determinó utilizando estos dos tipos de sistemas (abierto-cerrado y flujo detenido).

Configuración flujo detenido :

PROCEDIMIENTO

En una configuración como la que se muestra en la figura 3.2 se inyectaron 120 μL de disoluciones de urea de concentraciones 0.2, 0.4, 0.5, 1.0 y 2.0 mM en la disolución portadora de ureasa. Cuando el bolo de muestra llega al detector, 33 seg. después de la inyección, el flujo se detiene para que en la celda de flujo del detector continúen tanto la reacción enzimática como la de la formación de indofenol. De esta manera, se obtiene una señal creciente hasta que la reacción enzimática finaliza y la señal se mantiene constante. En este momento (5 minutos después de la inyección) el flujo se restablece y la señal regresa a la línea base, pudiéndose entonces realizar una nueva inyección de urea.

Configuración abierto-cerrado:

PROCEDIMIENTO

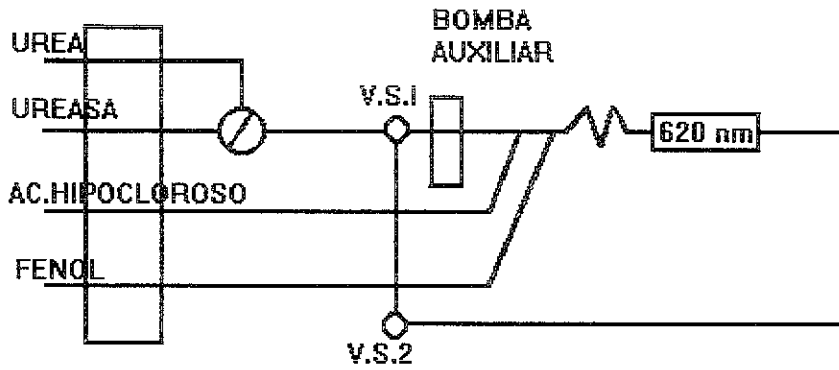
Se inyectaron por triplicado disoluciones de urea de concentraciones 0.125, 0.5, 1.25, y 2.5 mM

Para esta determinación la configuración que se utilizó se muestra en la figura 3.3.

120 μL de la disolución de urea se inyectan en la disolución portadora, (ureasa en fosfatos). Una vez que el bolo de muestra ha pasado a través de la celda de flujo del detector, las válvulas de selección V.S.1 y V.S.2 se colocan en posición de cerrado, quedando el bolo de muestra atrapado dentro de un circuito, pasando, con ayuda de la bomba auxiliar, de manera iterativa a través de la celda del detector. (Figura 3.3. (B)) De esta manera se obtienen una serie de picos que

incrementan su altura a medida que la reacción enzimática continúa desarrollándose.

(A)



(B)

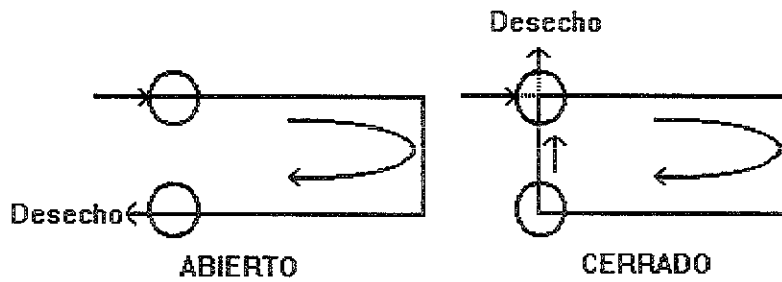


Fig. 3.3. (A) Configuración para la determinación la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa en disolución. Sistema abierto-cerrado. (B) Detalle que muestra el funcionamiento de la configuración abierto-cerrado.

3.2.2. Ureasa inmovilizada en alginato

3.2.2.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO/UREA

PROCEDIMIENTO

La figura 3.4. muestra la configuración utilizada para la determinación de amonio y urea integrando el reactor enzimático empacado con la ureasa inmovilizada en alginato

Se preparó un reactor enzimático (RE) empacando un tubo de vidrio de 3 mm D.I. con las esferas de alginato-ureasa, previamente rehidratadas con cloruro de calcio 5 mM.

El reactor enzimático (RE) se integró a la configuración como se muestra en la figura 3.4. El cloruro de calcio utilizado como disolución portadora mantiene las esferas de alginato-ureasa hidratadas, pero impide que se hinchen de manera excesiva.

Se prepararon disoluciones patrón de amonio en concentraciones 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.5 mM. 120 μ l de la disolución de amonio se inyectaron en una configuración como la que se muestra en la figura 3.4. Al pasar el bolo por el reactor enzimático no se lleva a cabo ninguna reacción, sin embargo, el bolo sufre la misma dispersión física que para la determinación de urea. El bolo que contiene amonio reacciona con el ácido hipocloroso y el fenolato para formar el indofenol.

Para la determinación de urea, se preparó una disolución de urea 10 mM. A partir de ésta se realizaron diluciones para obtener las disoluciones patrón entre 0.1 y 1.5 mM.

Utilizando la misma configuración que se muestra en la figura 3.4, 120 μ l de la disolución de urea se inyectan en la disolución portadora. La muestra pasa a través del reactor RE en donde ocurre la reacción enzimática. El amonio resultante se determina por la formación del indofenol.

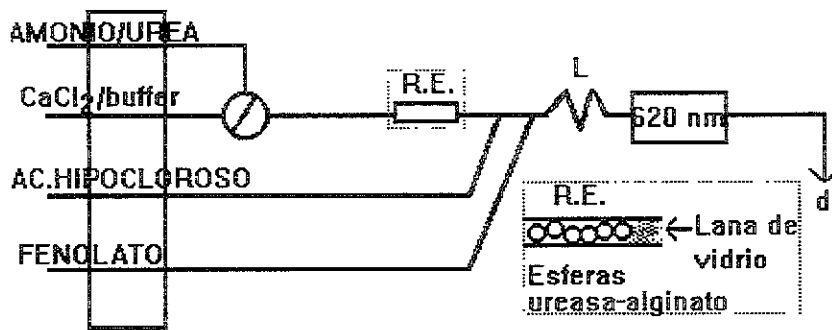


Fig. 3.4. Determinación de amonio/urea. Ureasa inmovilizada en alginato.

3.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UREASA

PROCEDIMIENTO

120 μ l de la disolución de urea se inyectaron en la disolución portadora, como se muestra en la figura 3.5. La muestra pasa a través de la válvula de selección V.S.1, la bomba auxiliar y finalmente a través del reactor RE en donde ocurre la reacción enzimática. Una vez que el bolo llega a la celda de flujo del detector, las válvulas de selección V.S.1 y V.S.2 se colocan en posición de cerrado, de esta manera el bolo de muestra queda atrapado dentro de un circuito. El paso iterativo del bolo a través del reactor enzimático y la celda de flujo del detector da por resultado una serie de picos que incrementan su altura cada vez que pasa por el reactor enzimático. Una vez que la reacción enzimática se ha completado, la altura de los picos comienza a disminuir debido a la dispersión del bolo en el sistema.

Se inyectaron por triplicado disoluciones de urea de concentraciones 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mM.

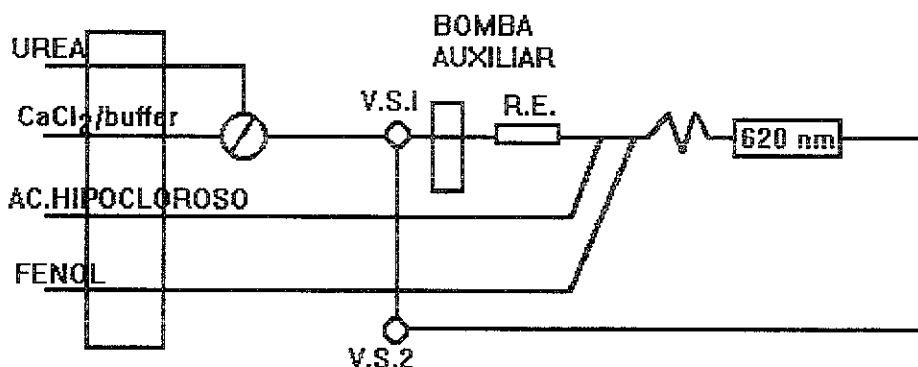


Fig. 3.5. Configuración para la determinación la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa inmobilizada en alginato. Sistema abierto-cerrado.

3.2.3. Ureasa inmobilizada en CPG

3.2.3.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO/UREA

PROCEDIMIENTO

La figura 3.6. muestra la configuración utilizada para la determinación de amonio y urea integrando el reactor enzimático empacado con la ureasa inmobilizada en CPG.

El reactor enzimático utilizado es un trozo de manguera de PVC de 1.3 cm de longitud y 0.1 mm D.I. empacado con las microesferas de CPG-ureasa. En este caso, no es necesario utilizar disolución de cloruro de calcio como portadora, por lo que se utiliza únicamente la disolución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.

Se prepararon disoluciones patrón de amonio en concentraciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mM. 120 µl de estas disoluciones se inyectan en la disolución portadora para obtener la curva de calibración de amonio en un sistema en el que el bolo sufre la misma dispersión física que para la determinación de urea.

Utilizando la misma configuración mostrada en la figura 3.6, 120 µl de las disoluciones de urea, preparadas en un intervalo entre 0.05 y 10.0 mM, se

inyectan en la disolución portadora. La muestra pasa a través del reactor RE en donde ocurre la reacción enzimática.

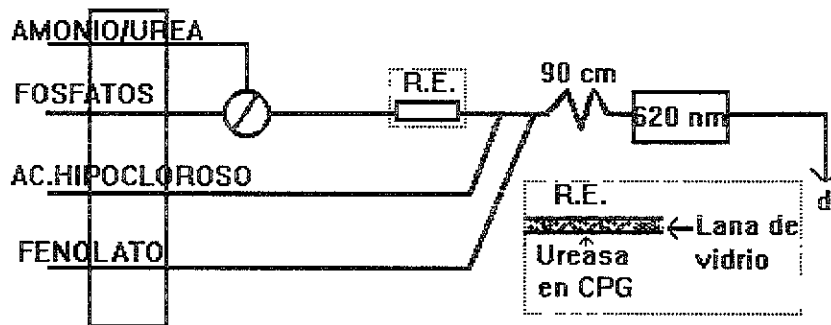


Fig. 3.6. Configuración para la determinación de amonio/urea. Ureasa inmovilizada en CPG.

3.2.3.2. INTEGRACIÓN DE UN BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA

PROCEDIMIENTO

La determinación de la actividad enzimática de la ureasa se realizó por flujo detenido utilizando una configuración como la que se muestra en la figura 3.7.

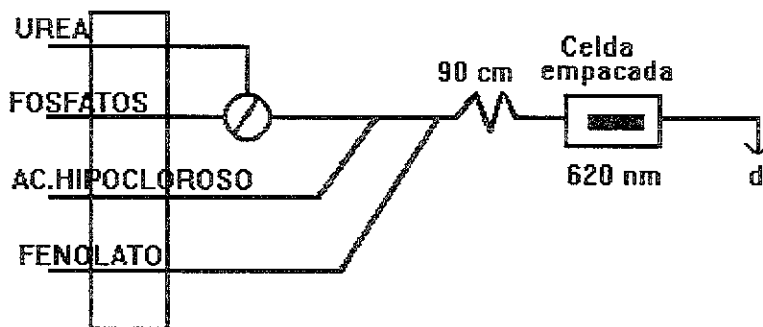


Fig. 3.7. Configuración para la determinación de la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa inmovilizada en CPG. Sistema flujo detenido.

Se inyectan 500 μ l de urea en la disolución portadora (buffer fosfatos). Una vez que el bolo de muestra ha llegado al detector (50 segundos después de la inyección) se detiene el flujo, de tal manera que en la celda ocurren tanto la reacción enzimática como la formación del indofenol, obteniéndose una señal creciente hasta que la reacción enzimática finaliza. La bomba peristáltica se vuelve a encender después de 5 minutos y se realiza una nueva inyección de urea.

En esta configuración se utilizó una celda de flujo de 0.1 cm de paso óptico, empacada con la enzima inmovilizada en CPG como se muestra en la figura 3.8.

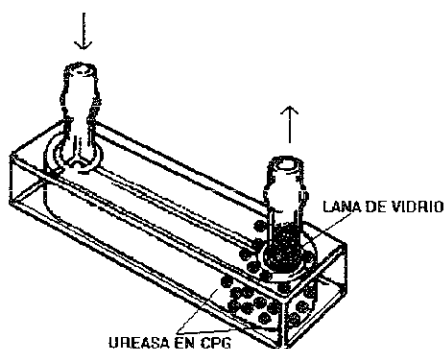


Fig. 3.8. Celda de flujo empacada con la enzima inmovilizada en CPG.

3.3. INHIBICIÓN DE UREASA POR MERCURIO

Se estudió la inhibición de la enzima por mercurio y los diferentes mecanismos para la regeneración de ésta, a fin de evaluar la posibilidad de utilizar a la ureasa para la determinación de mercurio. Este metal inhibe la disociación de urea al unirse a los grupos tiol de la ureasa. La determinación es una modificación al método propuesto por Bryce, Fernández-Romero y Luque de Castro (98), está basada en el monitoreo de la reacción enzimática inhibida y no inhibida (blanco) al ser inyectada una disolución de urea, ésta pasa por el reactor enzimático y el amonio resultante confluye con las disoluciones de ácido hipocloroso y fenol. El decremento en la señal por la inhibición de la ureasa es proporcional a la concentración de mercurio.

3.2.1. Optimización del tiempo de inhibición

PROCEDIMIENTO

La figura 3.9. muestra la configuración propuesta para la determinación de mercurio.

Por medio de la válvula V.I.1 se inyectan 120 μL de urea 4 mM, que pasa por el reactor enzimático que se encuentra en el bucle de la válvula de inyección V.I.2, estando ésta en posición de inyección. La señal obtenida corresponde al blanco.

Inhibición. La válvula de inyección V.I.2 se cambia a posición de llenado para que la disolución de mercurio pase por el reactor enzimático por un tiempo predeterminado (Fig. 3.10.A). Una vez transcurrido éste, la válvula V.I.2 se pasa a posición de inyección y se inyecta la urea en la V.I.1 (Fig. 3.10.B). El decremento en la señal obtenida con respecto a la señal del blanco es proporcional a la concentración de mercurio.

Para elegir el tiempo de inhibición debe tenerse un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis.

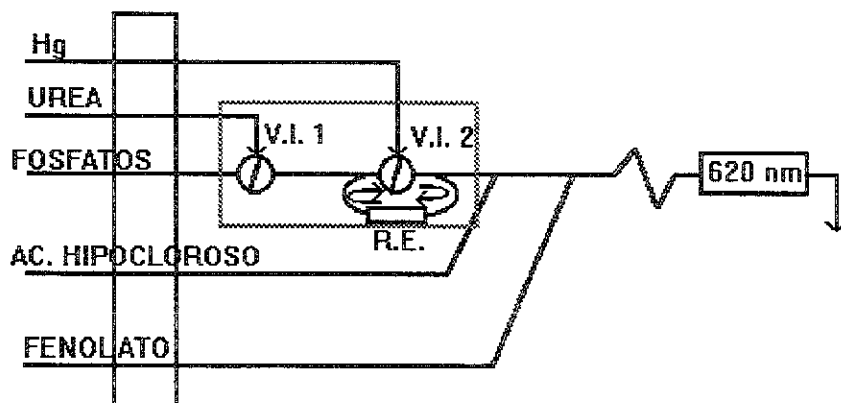


Fig. 3.9. Configuración para la determinación de mercurio. Optimización del tiempo de inhibición.

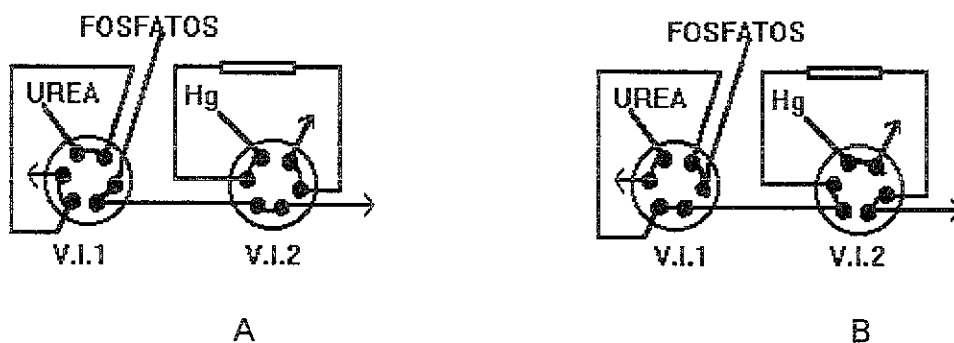


Fig. 3.10. Conexión de las válvulas de inyección. (A) Ciclos de inhibición. (B) Medición.

3.3.2. Regeneración de la enzima por tiempo

PROCEDIMIENTO

La figura 3.11. muestra la configuración utilizada para la determinación de mercurio. Esta configuración consta de dos sub-sistemas: el sistema de inhibición/regeneración, constituido por las disoluciones de Hg, EDTA y el reactor enzimático, y el sistema de detección, que consta de la disolución de urea, el reactor enzimático, el ácido hipocloroso y el fenolato.

Cuando la válvula de inyección V.I.2 está en posición de llenado, se elige entre la disolución regeneradora y la de mercurio (ver figura 3.10. A y B).

Se realiza la inyección para la señal del blanco y la inhibición de la ureasa con mercurio como se describió en la sección anterior.

Regeneración: Se elige la disolución de EDTA por medio de la válvula de selección; ésta se hace pasar a través del reactor enzimático por un tiempo predeterminado, después del cual la válvula V.I.2 se pasa a posición de inyección. En la válvula V.I.1 se inyectan 120 μ l de urea 2.5 mM, que pasa por el reactor enzimático y confluye con las disoluciones de ac. hipocloroso y fenolato. El tiempo de regeneración se elige de manera que la señal obtenida sea igual a la señal obtenida inicialmente por el blanco. Una vez regenerada la enzima se repite el proceso de inhibición.

Inhibición. Se elige la posición de la válvula de selección para que pase ahora la disolución de mercurio por el reactor enzimático por el tiempo predeterminado ya establecido. Una vez transcurrido éste, la válvula V.I.2 se pasa a posición de inyección y se inyecta la urea en la V.I.1. El decremento en la señal obtenida debe ser reproducible después de cada ciclo inhibición-regeneración-inhibición.

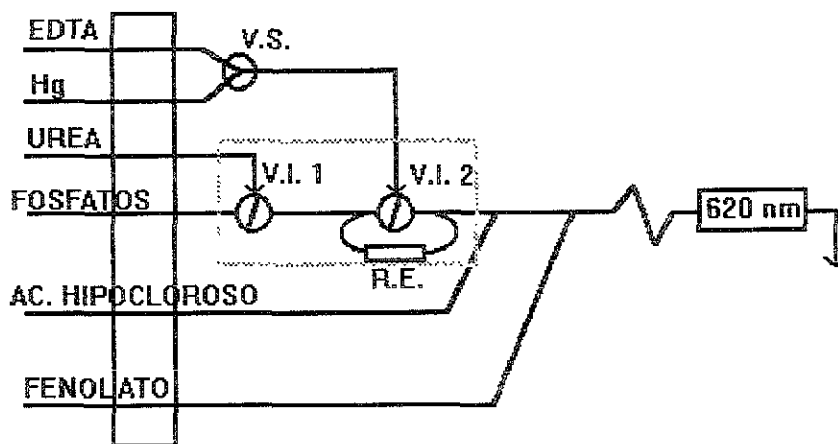


Fig. 3.11. Configuración para la determinación de mercurio. Regeneración por tiempo.

3.3.3. Regeneración de la enzima por pulso

PROCEDIMIENTO

El procedimiento utilizado en la configuración que se muestra en la figura 3.12. se basa en el mismo principio que el de la figura 3.11., únicamente que en éste la ureasa es regenerada por el paso de un pulso de disolución de EDTA.

Una vez concluído el ciclo de inhibición y determinado el decremento en la señal de urea 2.5 mM, se inyectan 120 μ l de la disolución de EDTA por medio de la válvula V.I. 1, manteniendo la V.I. 2 en posición de inyección, de manera que el bolo de EDTA inyectado pase a través del reactor enzimático y regenere a la ureasa. Posteriormente se realizan las inyecciones de urea 2.5 mM para verificar que la enzima ha sido regenerada.

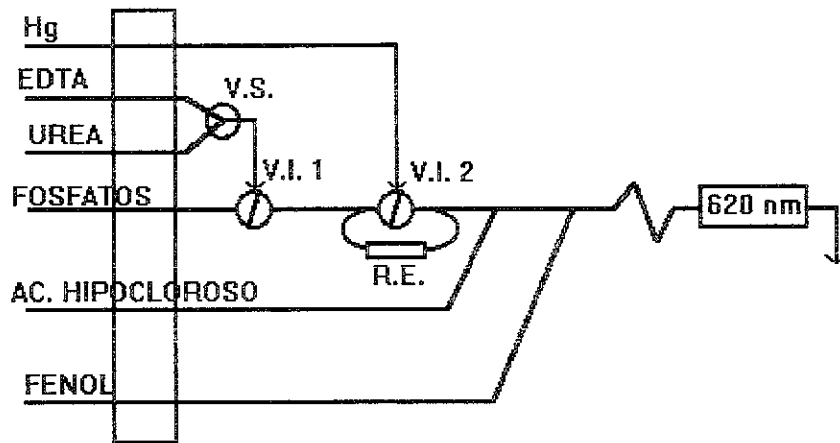


Fig. 3.12. Configuración para la determinación de mercurio. Regeneración por pulso.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. INMOVILIZACIÓN DE LA UREASA

4.1.1. Inmovilización en alginato

Se inmovilizó la ureasa en alginato como se describe en la sección 3.1.1. Si el total de la enzima queda inmovilizada en la matriz polimérica y toda esa actividad se expresa, la actividad de la enzima inmovilizada sería de 16.89 UI/g de alginato.

La enzima queda atrapada entre los espacios intersticiales de la matriz polimérica (Fig. 4.1.), por lo que el sustrato debe difundir hacia el interior de la red polimérica para que ocurra la reacción enzimática y posteriormente el producto difunda hacia el exterior.

Las esferas de alginato-enzima deshidratadas obtenidas tienen un diámetro entre 0.7-0.9 cm. Al hidratarse alcanzan un diámetro entre 1.0-1.2 cm.

Los resultados de la evaluación de la enzima inmovilizada en alginato (determinación de urea y actividad enzimática) se muestran en las secciones 4.2.2.

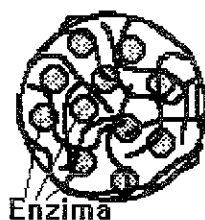


Fig. 4.1. Inmovilización de la ureasa en alginato.

4.1.2. Inmovilización en vidrio de poro controlado

La ureasa se inmovilizó en vidrio de poro controlado como se describe en la sección 3.1.2. Si el total de la enzima queda inmovilizada en el CPG, la actividad de la enzima inmovilizada sería de 337.9 UI/g de vidrio.

Existe al menos una unión covalente entre la enzima y la superficie del vidrio funcionalizado, pudiéndose producir un cambio en la estructura tridimensional de la ureasa (Fig. 4.2). Existe una gran superficie de contacto favoreciendo la reacción enzimática.

Los resultados de la evaluación de la enzima inmovilizada en alginato (determinación de urea y actividad enzimática) se discuten en las secciones 4.2.3.

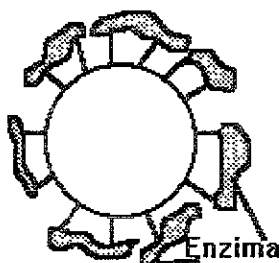


Fig. 4.2. Inmovilización de la ureasa en microesferas de vidrio de poro controlado.

4.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA

4.2.1. Ureasa en disolución

4.2.1.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO POR FIA

Se inyectó una disolución 0.41 mM de urea en una configuración como la mostrada en la figura 3.1. En base a los valores reportados en la bibliografía (61), se variaron las concentraciones de los reactivos así como el volúmen de inyección, flujo de la disolución portadora, volúmenes de inyección y longitudes de reactores con el fin de optimizar los valores a obtener la señal más intensa.

En la tabla 4.1. se muestran los datos de optimización de las variables químicas y las variables FIA.

Con los valores óptimos se inyectaron por cuadruplicado las disoluciones estándar de amonio utilizando la configuración y el procedimiento descrito en la sección 3.2.1.1. obteniéndose el fiagrama que muestra la figura 4.3.

Tabla 4.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA LA DETERMINACIÓN DE AMONIO

VARIABLE	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Conc. hipoclorito (%V/V)	0.625 - 1.875	1.25
Conc. NaOH (g/mL)	0.010 - 0.030	0.025
Conc. fenol (g/mL)	0.05 - 0.15	0.10
Flujo (mL/min)	0.5 - 1.5	1.0
Vol. de inyección (μL)	120 - 220	120 *
L1 (cm)	10 - 50	30
L2 (cm)	50 - 120	90

*Nota: 120 μL corresponden al volúmen mínimo de la válvula de inyección.

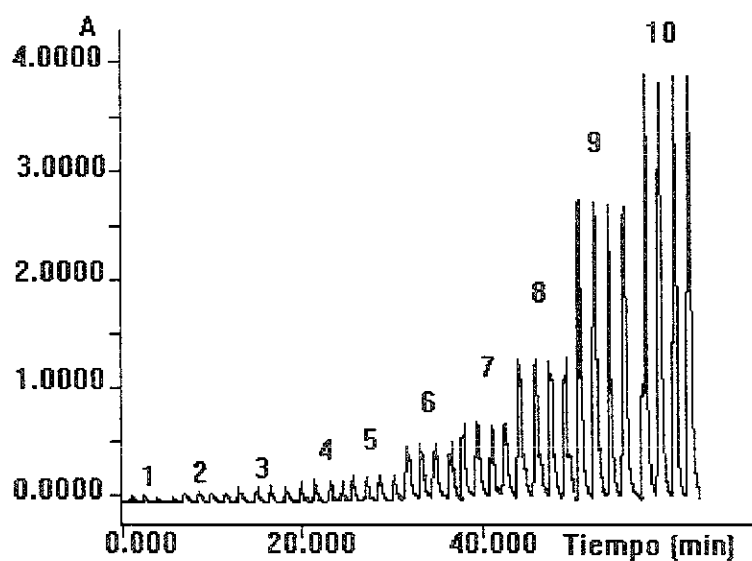
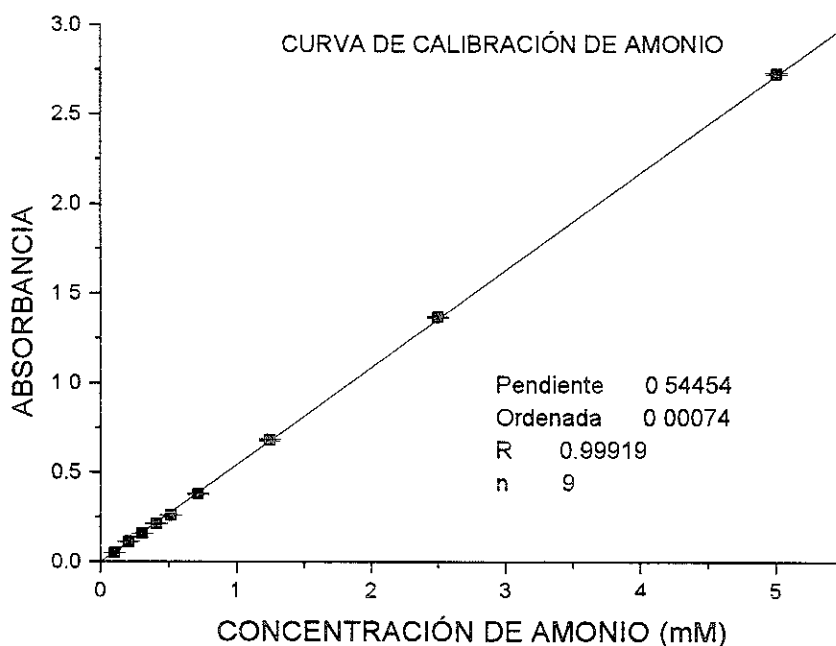


Fig. 4.3. Determinación de amonio por FIA. 1: 0.102 mM; 2: 0.205 mM; 3: 0.307 mM; 4: 0.410 mM; 5: 0.513 mM; 6: 0.821 mM; 7: 1.280 mM; 8: 2.565 mM; 9: 5.130 mM; 10: 10.26 mM.

Los valores de altura de pico (absorbancia máxima - absorbancia línea base) graficados en función de la concentración, se muestran en la gráfica 4.1.



Gráfica 4.1. Determinación de amonio FIA. De los puntos correspondientes a la figura 4.1. Únicamente se encuentran graficados los puntos que entran en intervalo lineal.

4.2.1.2. DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE UREA

Una vez optimizada la determinación de amonio, se inyectaron disoluciones estándar de urea de acuerdo a la configuración y procedimiento descrito en la sección 3.2.1.2., obteniéndose el fiagrama que se muestra la figura 4.4.

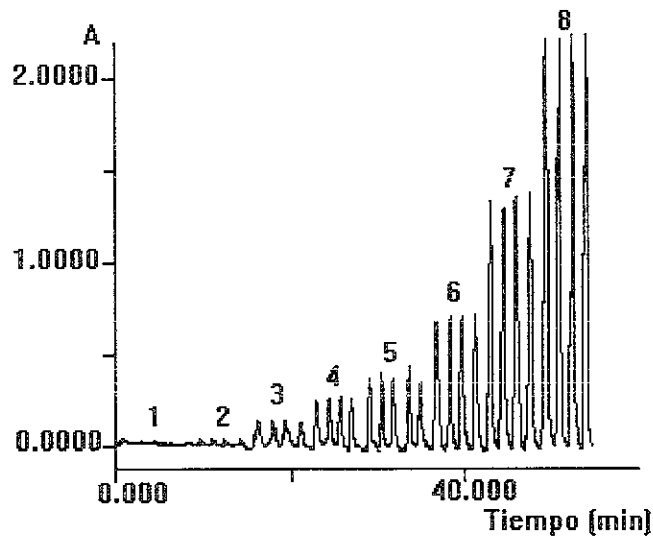
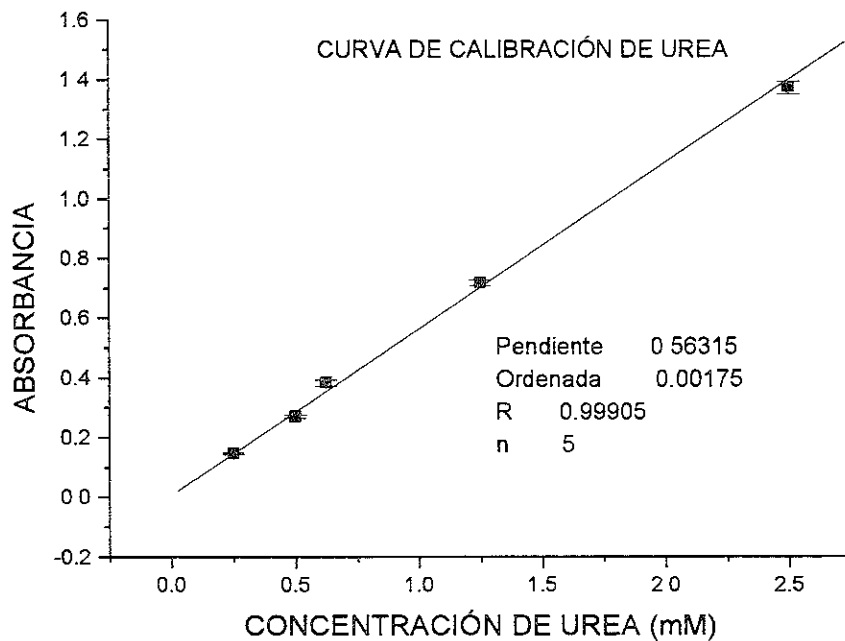


Fig. 4.4. Determinación de urea por FIA. Ureasa en disolución. 1: 0.0625 mM; 2: 0.125 mM; 3: 0.250 mM; 4: 0.500mM; 5: 0.625 mM; 6: 1.250 mM; 7: 2.5 mM; 8: 5.000 mM.

Los datos correspondientes a éste se encuentran en la gráfica 4.2.



Gráfica 4.2. Determinación de urea por FIA. Ureasa en disolución. De los puntos correspondientes a la figura 4.4. únicamente se encuentran graficados los puntos que entran en intervalo lineal.

Tabla 4.2. CUADRO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO Y DE UREA. UREASA EN DISOLUCIÓN

DETERMINACIÓN	PENDIENTE	R	INTERVALO LINEAL
Amonio	0.5445	0.99919	0.1-5.0 mM
Urea	0.5631	0.99905	0.25-2.5 mM

Como puede apreciarse en la tabla 4.2, para este sistema, las pendientes de la recta de calibración para amonio es muy similar que la de la calibración para urea, a pesar de que la relación molar de la reacción enzimática sea 2:1 amonio/urea. Lo anterior se debe a que la enzima está en contacto con el sustrato, y en consecuencia hay reacción enzimática, a través de todo el sistema de transporte.

Calculando la efectividad de la enzima en este sistema, definida por la ecuación (2.28.) como $\eta = [P] / [S]_0$, se obtiene un valor de 0.5171 (51.71%).

4.2.1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA UREASA

Configuración abierto-cerrado:

Se inyectaron por triplicado disoluciones de urea de concentraciones 0.125, 0.5, 1.25, y 2.5 mM siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.1.3.

El fiagrama obtenido de esta configuración abierto-cerrado se muestra en la figura 4.5.

El cálculo de la velocidad inicial se realizó utilizando el método integral tomando medidas a tiempo fijo (15, 28), tomando como tiempo inicial el momento de realizar la inyección. Con los valores de absorbancia, y refiriéndolos a la curva de calibración de amonio, se calculó la concentración de amonio (en μM)

producido por la reacción enzimática por segundo. Los datos se graficaron en función de la concentración de urea y se obtuvo la gráfica 4.3.

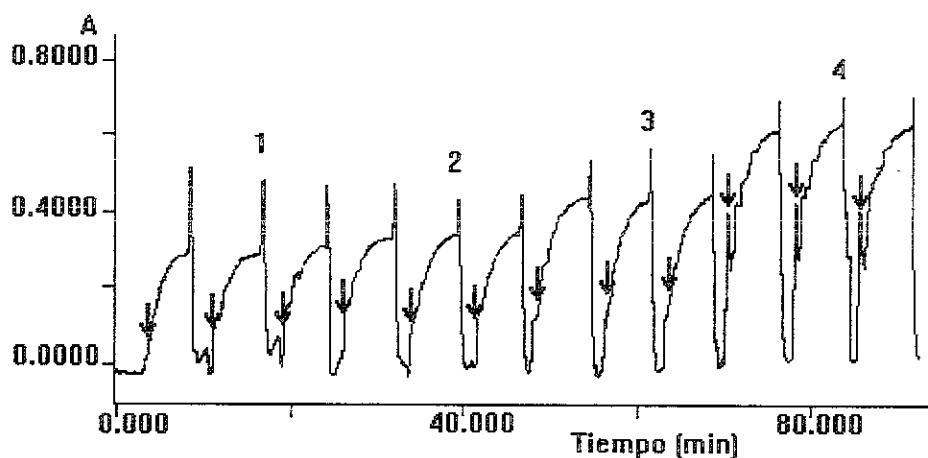
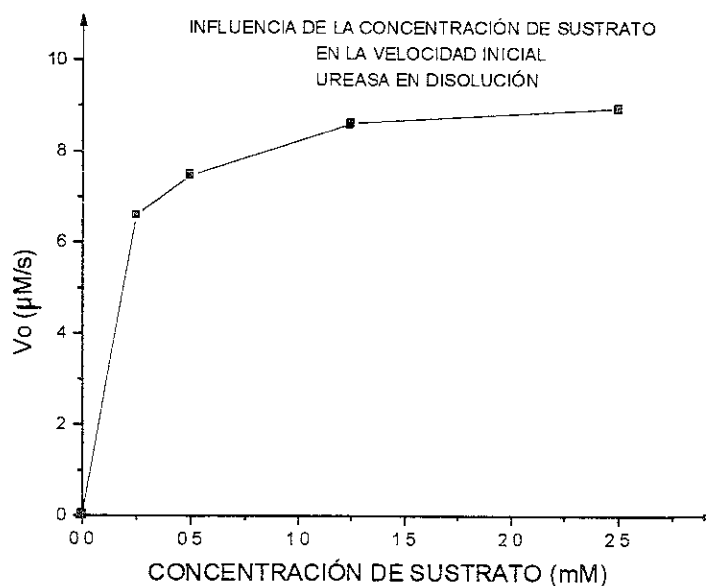
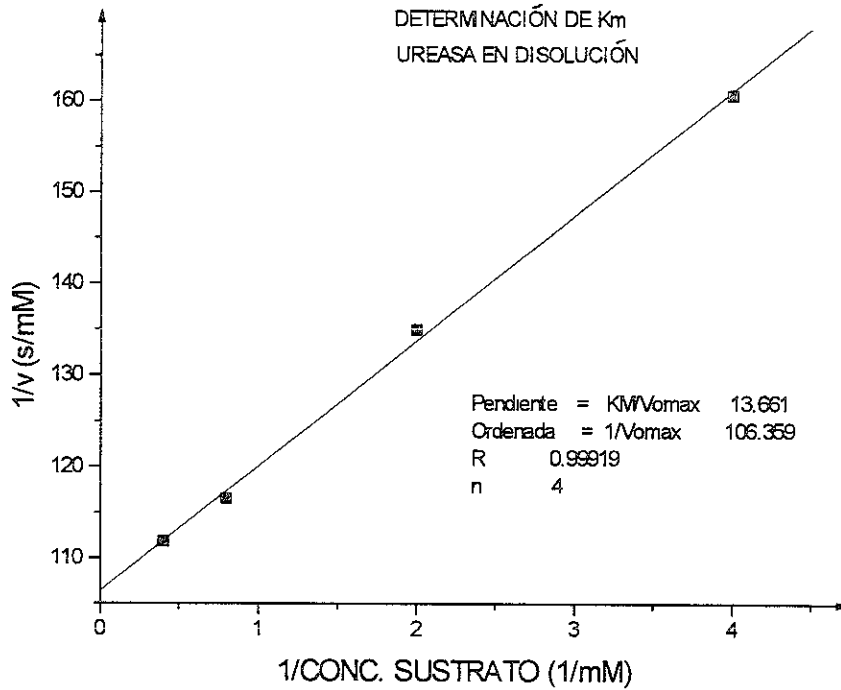


Fig. 4.5. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa en disolución. 1: 0.125 mM; 2: 0.500 mM; 3: 1.250 mM; 4: 2.500 mM. Las flechas indican los valores de absorbancia para calcular la velocidad inicial.

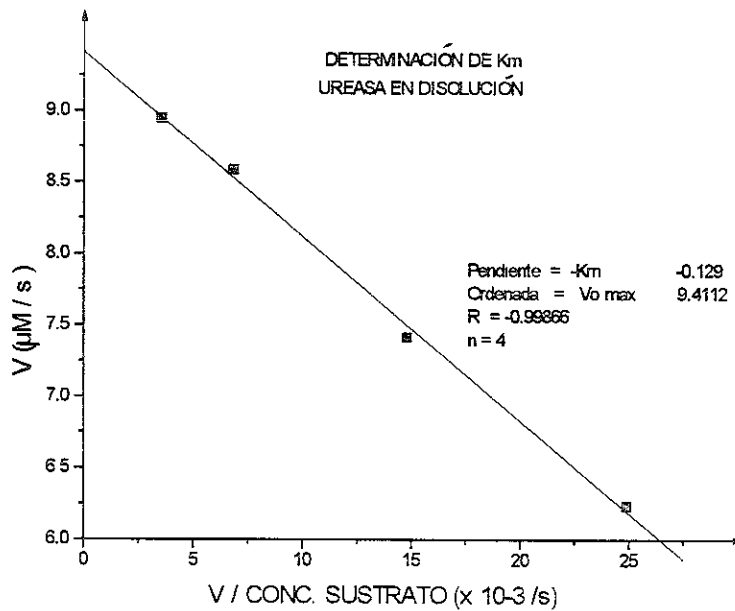


Gráfica 4.3. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial. Ureasa en disolución. Configuración abierto-cerrado.

Para evaluar la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima se realizaron la trasposición de Lineweaver y Burke y la de Hofstee y Eadie, obteniéndose las gráfica 4.4. y 4.5. respectivamente.



Gráfica 4.4. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Lineweaver y Burke. Ureasa en disolución. Configuración abierto-cerrado.



Gráfica 4.5. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Hofstee y Eadie. Ureasa en disolución. Configuración abierto-cerrado.

Configuración flujo detenido:

Se inyectaron por triplicado disoluciones de urea de concentraciones 0.2, 0.4, 0.5, 1.0 y 2.0 mM siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.1.3. para la determinación en flujo detenido .

El fiagrama obtenido de esta configuración se muestra en la figura 4.6.

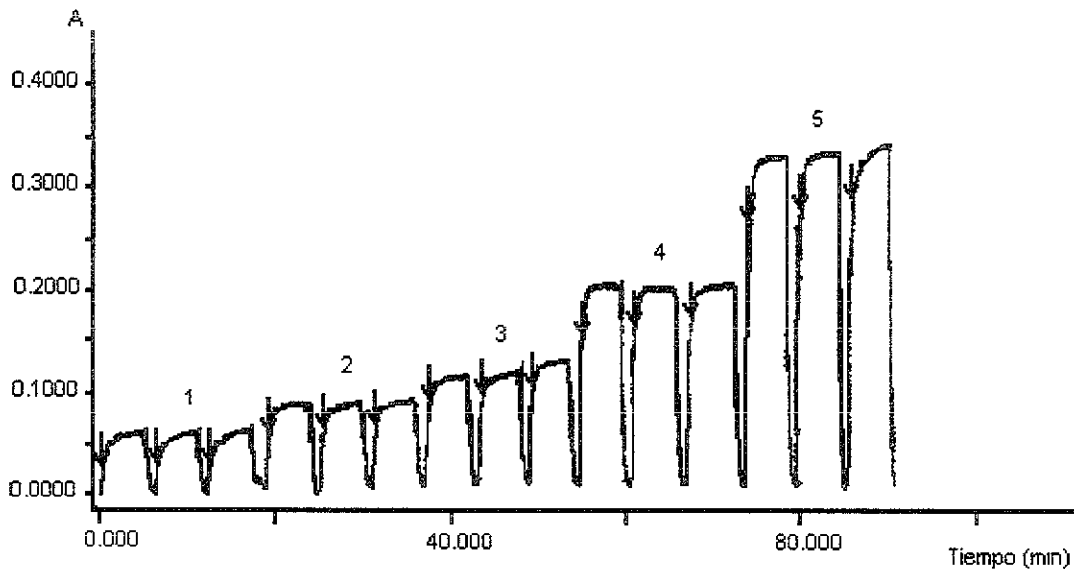
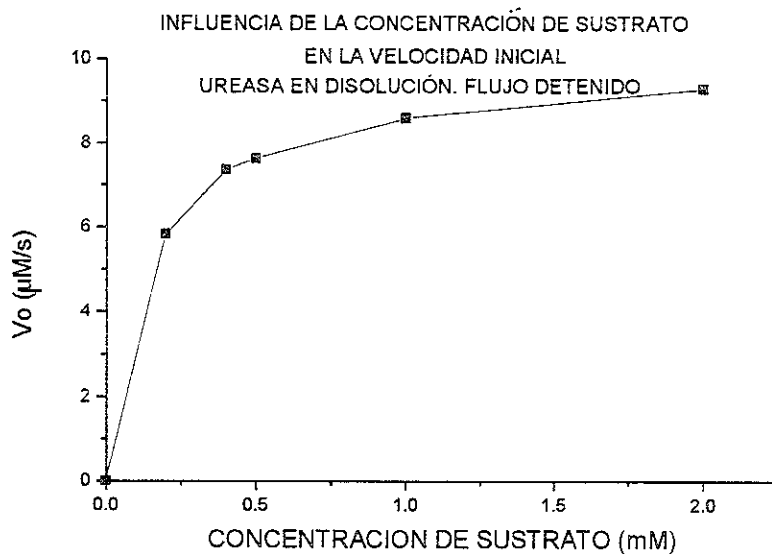


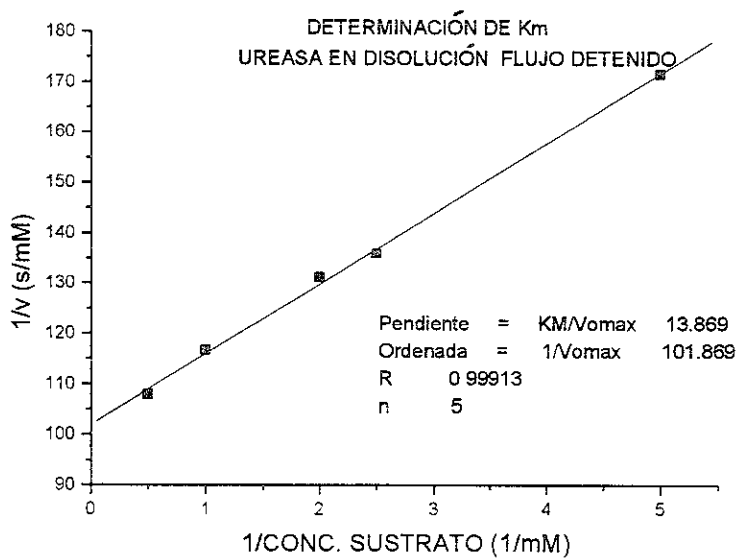
Fig. 4.6. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa en disolución. 1: 0.2 mM; 2: 0.4 mM; 3: 0.5 mM; 4: 1.0 mM; 5: 2.0 mM. Las flechas indican los valores de absorbancia para calcular la velocidad inicial.

Nuevamente se realizó el cálculo de la velocidad inicial utilizando el método integral tomando medidas a tiempo fijo (33 segundos después de la inyección). Con los valores de absorbancia, y refiriéndolos a la curva de calibración de amonio, se calculó la concentración de amonio (en μM) producido por la reacción enzimática por segundo. Los datos se graficaron en función de la concentración de urea y se obtuvo la gráfica 4.6.

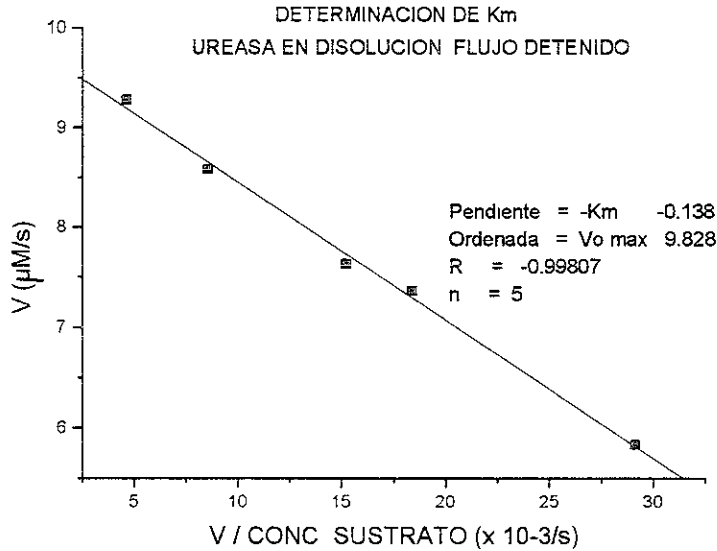


Gráfica 4.6. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial. Ureasa en disolución. Configuración abierto-cerrado.

Las trasposiciones de Lineweaver y Burke y de Hofstee y Eadie para evaluar los parámetros cinéticos se muestran en las gráficas 4.7. y 4.8. respectivamente.



Gráfica 4.7. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Lineweaver y Burke. Ureasa en disolución. Configuración flujo detenido.



Gráfica 4.8. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Hofstee y Eadie. Ureasa en disolución. Configuración flujo detenido.

En la tabla 4.3 se encuentran resumidos los resultados obtenidos del tratamiento de resultados. Al observar estos resultados se puede decir que el cálculo de los parámetros cinéticos y la actividad de la enzima utilizando cualquiera de las dos trasposiciones es prácticamente el mismo, sin embargo, el valor de R para la recta obtenida por medio de la trasposición de Hofstee y Eadie es menor que el obtenido para la trasposición de Lineweaver y Burke. Esto es debido a que en la ecuación utilizada para la trasposición de Hofstee y Eadie

$$V_o = -K_M \frac{V_o}{[S]} + (V_o)_{\max}$$

los valores experimentales (V_o) se encuentran en ambos lados de la ecuación, por lo que la dispersión de los resultados se ve afectada tanto en el eje de las abscisas como en el eje de las ordenadas.

TABLA 4.3. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UREASA. UREASA EN DISOLUCIÓN

Abierto-Cerrado	Pendiente	Ordenada al origen	R	$(V_0)_{\max}$ ($\mu\text{mol/L seg}$)	K_M (mM)	Actividad (UI/L)
Lineweaver y Burke	13.661	106.359	0.99919	9.402	0.128	564
Hofstee y Eadie	-0.129	9.411	0.99866	9.411	0.129	565
Flujo detenido	Pendiente	Ordenada al origen	R	$(V_0)_{\max}$ ($\mu\text{mol/L seg}$)	K_M (mM)	Actividad (UI/L)
Lineweaver y Burke	13.869	101.869	0.99913	9.816	0.136	589
Hofstee y Eadie	-0.138	9.828	0.99807	9.828	0.138	590

4.2.2. Ureasa inmovilizada en alginato

4.2.2.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO/UREA

La figura 4.7. muestra el diagrama obtenido al inyectar estándares de amonio en concentraciones 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.5 mM. en una configuración como la que se muestra en la figura 3.4.

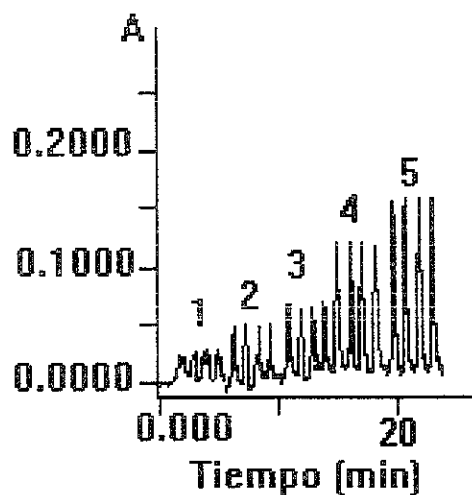
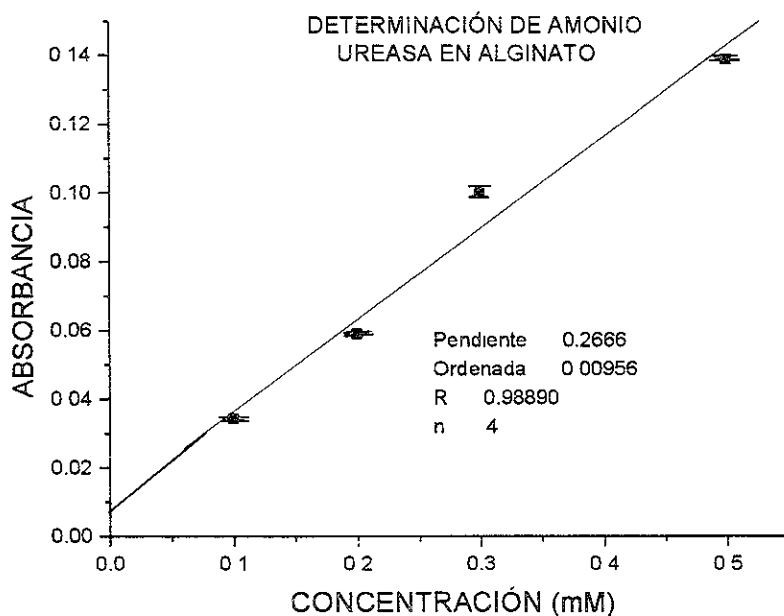


Fig. 4.7 Determinación de amonio. Ureasa inmovilizada en alginato. 1: 0.1 mM; 2: 0.2mM; 3: 0.3mM; 4: 0.5mM; 5: 1.5 mM.

Los valores de altura de pico (en unidades de absorbancia) graficados en función de la concentración de amonio se muestran en la gráfica 4.9.



Gráfica 4.9. Determinación de amonio. Ureasa inmovilizada en alginato. De los puntos correspondientes a la figura 4.7. únicamente se graficaron los que entran en intervalo lineal.

Posteriormente se procedió a realizar la determinación enzimática de urea. Se empacó un tubo de vidrio con las esferas de ureasa inmovilizada en alginato previamente hidratadas. La longitud óptima del reactor se determinó en 2.5 cm.

El fiagrama obtenido al inyectar las disoluciones estándar, en concentraciones de 0.1 a 1.5 mM se muestra en la figura 4.8.

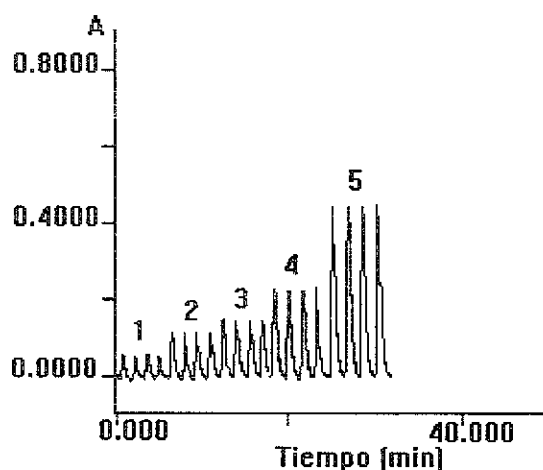


Fig. 4.8. Determinación de urea por FIA. Ureasa inmovilizada en alginato. 1: 0.1 mM; 2: 0.2mM; 3: 0.3mM; 4: 0.5mM; 5: 1.5 mM.

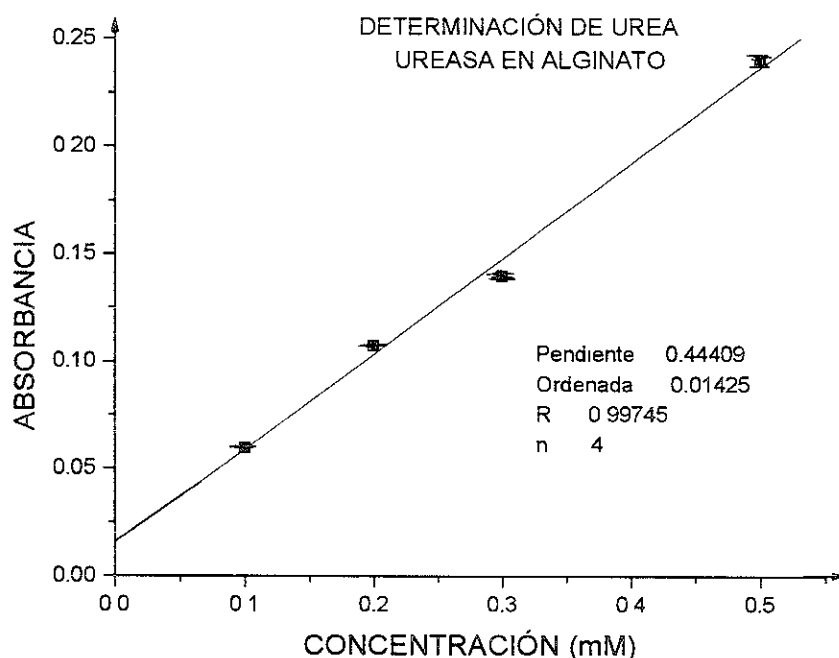
Los datos correspondientes a éste se encuentran en la gráfica 4.10., y en la tabla 4.4. se muestran los resultados para la determinación de amonio y de urea.

Al analizar los resultados de la tabla 4.4. se observa que en este caso, la pendiente de la recta para la curva de calibración de urea es aproximadamente del doble de magnitud (1.7 veces mayor) de la pendiente de la curva de calibración de amonio. En este caso, el sustrato atraviesa por el reactor enzimático, que constituye solamente una zona del sistema de transporte, manteniéndose la relación amonio-urea 2:1.

Al integrar el reactor enzimático en la configuración, el bolo de muestra debe atravesar una zona en donde sufre una mayor dispersión física. En el caso de la determinación de amonio, no ocurre ninguna reacción en el reactor enzimático, pero el bolo de muestra sí sufre dispersión física, obteniéndose en consecuencia una recta de calibración con un coeficiente de regresión bajo.

En el caso de la determinación de urea, el sustrato debe difundir al interior de la matriz polimérica, transformarse en amonio al contacto con la enzima y difundir éste producto al exterior. Por esta razón, aunado a la dispersión física que sufre el bolo en el reactor, el intervalo lineal y el valor de R de la recta de calibración es menor a la obtenida en el sistema de ureasa en disolución.

Para este sistema, el valor de η es de 0.8330 (83.30%).



Gráfica 4.10. Determinación de urea por FIA. Ureasa inmovilizada en alginato. De los puntos correspondientes a la figura 4.8. únicamente se graficaron los que entran en intervalo lineal.

Tabla 4.4. CUADRO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO Y DE UREA. UREASA EN ALGINATO

DETERMINACIÓN	PENDIENTE	R	INTERVALO LINEAL
Amonio	0.2666	0.98890	0.1-0.5 mM
Urea	0.4441	0.99745	0.1-0.5 mM

4.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UREASA

Con el reactor utilizado para la determinación de urea se montó la configuración abierto-cerrado (Fig. 3.3.) y se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.2.

Se inyectaron por triplicado disoluciones de urea de concentraciones 0.1, 0.2, 0.3, y 0.5 mM obteniéndose el fiagrama que se muestra en la figura 4.9.

Para poder calcular la actividad de la ureasa por gramo de alginato, se desempacó la columna y se dejaron secar las perlas de alginato. El peso del alginato seco con la ureasa inmovilizada fue de 0.0109 gramos.

A partir del fiagrama de la figura 4.9., se tomaron los valores de absorbancia a tiempo fijo (64 segundos), tomando como tiempo inicial el momento de realizar la inyección. Con los valores de absorbancia, y refiriéndolos a la curva de calibración de amonio, se calculó la velocidad inicial (en $\mu\text{mol/L seg}$) para cada concentración de sustrato. Los resultados de graficar la velocidad inicial en función de la concentración de urea se muestran en la gráfica 4.11.

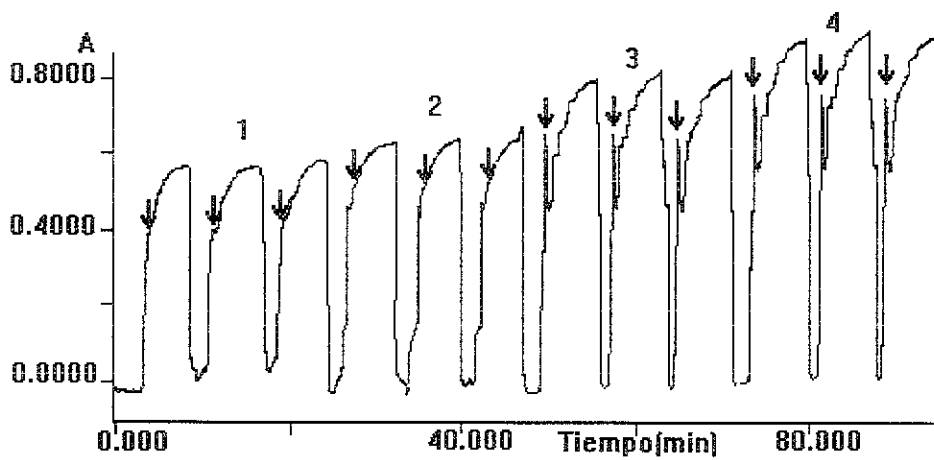
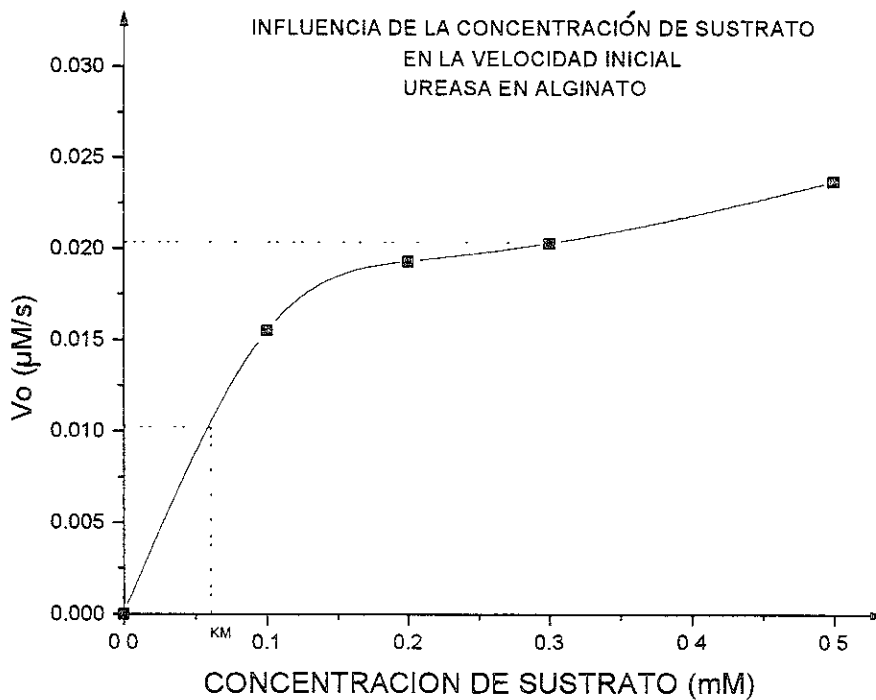
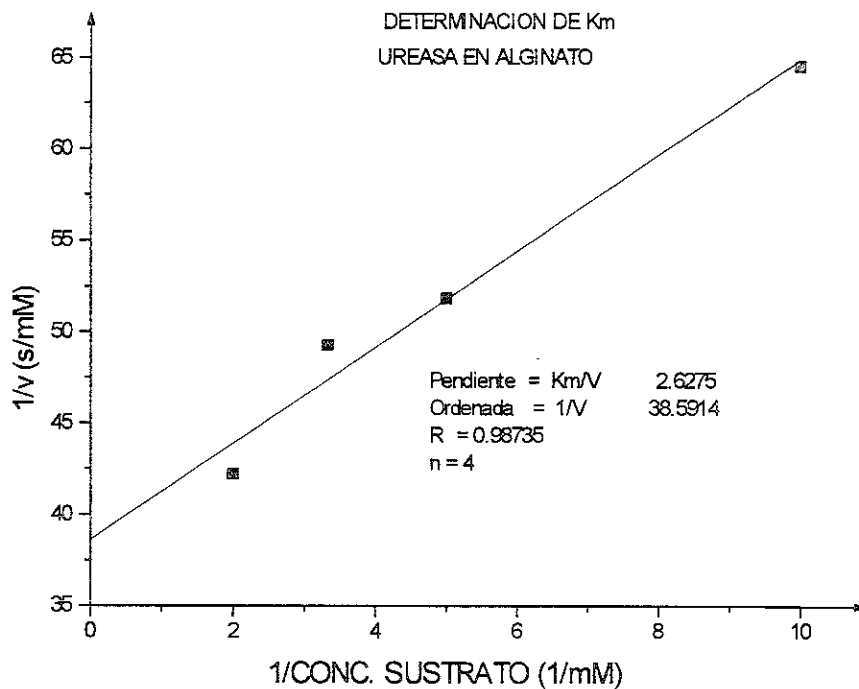


Fig. 4.9. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa inmovilizada en alginato. 1: 0.1 mM; 2: 0.2mM; 3: 0.3mM; 4: 0.5mM. Las flechas indican los valores de absorbancia para calcular la velocidad inicial



Gráfica 4.11. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial. Ureasa inmovilizada en alginato.

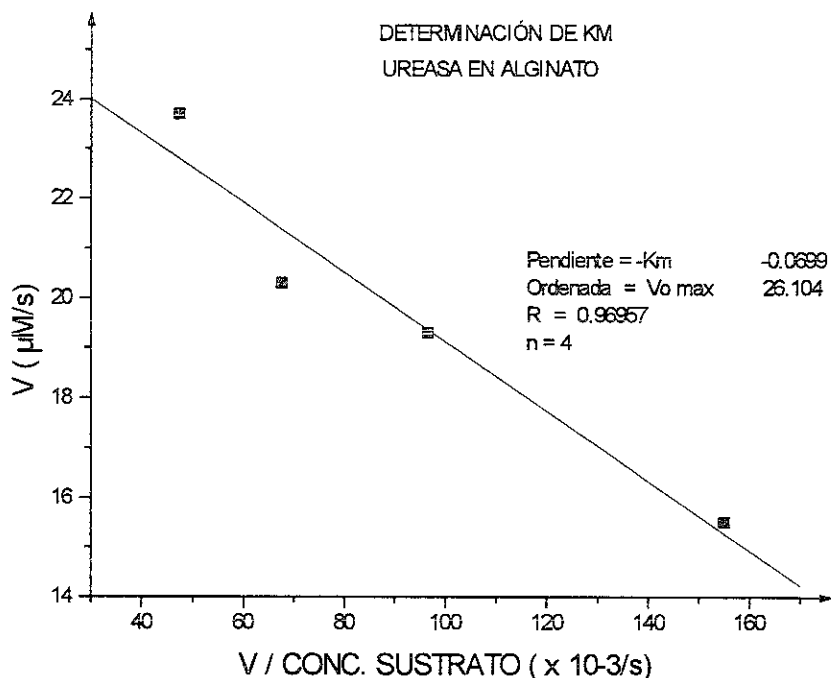
Se realizó la trasposición de Lineweaver y Burke y de Hofstee y Eadie, obteniéndose las gráficas 4.12. y 4.13. respectivamente.



Gráfica 4.12. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Lineweaver y Burke Ureasa inmovilizada en alginato.

Tomando en cuenta que se utilizaron 0.0109 g de alginato con ureasa inmovilizada, se calculó la actividad de la enzima por gramo de polímero.

Los valores de los parámetros cinéticos de la ureasa inmovilizada en alginato se encuentran resumidos en la tabla 4.5.



Gráfica 4.13. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Hofstee y Eadie. Ureasa inmovilizada en alginato.

TABLA 4.5. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UREASA. UREASA EN ALGINATO

	Pendiente	Ordenada al origen	R	$(V_0)_{\max}$ ($\mu\text{mol/L seg}$)	K_M (mM)	Actividad (UI/g)
Lineweaver y Burke	2.627	38.59	0.98730	25.912	0.068	17.11
Hofstee y Eadie	-0.069	26.10	0.96957	26.104	0.069	17.243

Como puede observarse en las gráficas 4.12 y 4.13, al realizar las transposiciones de Lineweaver y Burke y de Hofstee y Eadie, no se obtiene una línea recta, sino una curva, por lo que es más conveniente en este caso utilizar los términos V_s (velocidad que se alcanza cuando la enzima está saturada por el

sustrato) y K_v o K_M aparente (concentración del sustrato a la cual la velocidad de reacción es igual a $V_s/2$), como fueron definidos en la sección 1.3.2.

Estos resultados concuerdan con lo discutido en la sección 2.3.2., ya que en el caso de esta configuración, utilizando el reactor empacado con las esferas de alginato en donde fue inmovilizada la ureasa, la cinética enzimática se ve afectada por los términos de transferencia de masa interna y externa. Esta transferencia de masa dependerá del flujo y la geometría del soporte sólido (diámetro de partícula, porosidad, superficie externa, difusividad efectiva, etc.).

Se puede observar que la actividad de la enzima inmovilizada en alginato, al utilizarlo en un sistema de flujo continuo, en donde hay un carácter cinético inherente, es prácticamente igual a la actividad calculada considerando que el total de la enzima quedara inmovilizada en la matriz polimérica (16.89 UI/g).

4.2.3. Ureasa inmovilizada en CPG

4.2.3.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO/UREA

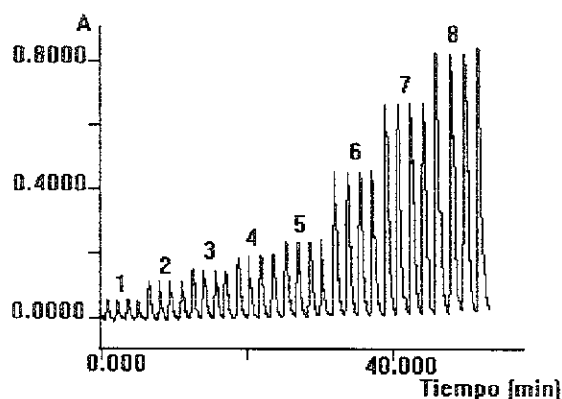
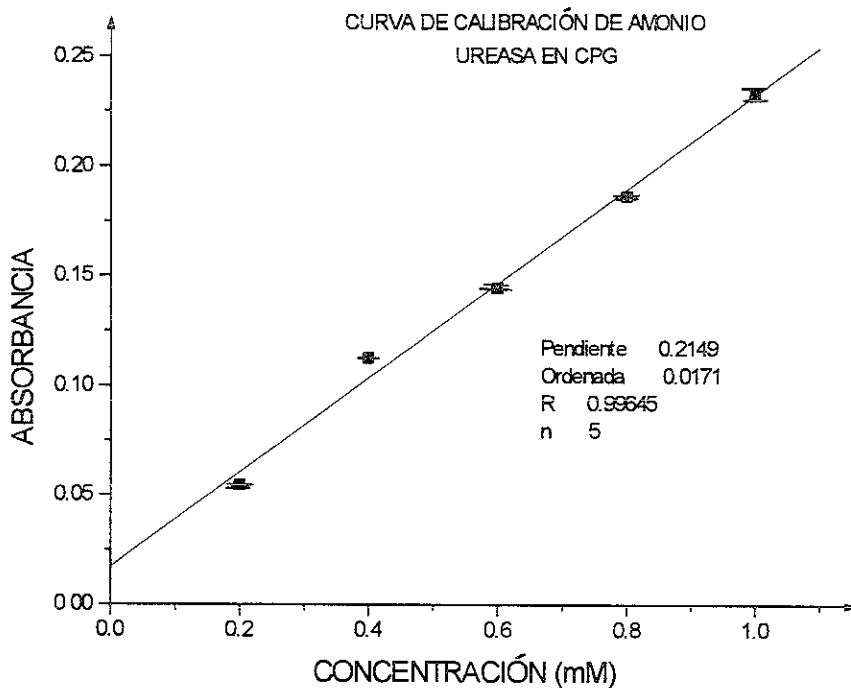


Fig. 4.10. Determinación de amonio. Ureasa inmovilizada en CPG. 1: 0.2mM; 2: 0.4mM; 3: 0.6mM; 4: 0.8 mM; 5: 1.0 mM; 6: 2.5 mM; 7: 5.0 mM; 8: 10.0 mM.

La figura 4.10. muestra el diagrama obtenido al inyectar estándares de amonio en concentraciones de 0.2 a 10 mM en una configuración como la que se

muestra en la figura 3.6., integrando un reactor de 0.127 cm D.I. y 1.3 cm de longitud, empacado con ureasa inmovilizada en CPG.

Los datos correspondientes a éste se encuentran en la gráfica 4.14.



Gráfica 4.14. Determinación de amonio. Ureasa inmovilizada en CPG. De la figura 4.10. se graficaron únicamente los puntos que quedan dentro del intervalo lineal.

Para la determinación enzimática de urea, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.3.1. se inyectaron disoluciones de urea en un intervalo de concentraciones entre 0.0625 y 10 mM. El fiagrama obtenido se muestra en la fig. 4.11.

Los resultados obtenidos al graficar alturas de pico (en unidades de absorbancia) en función de concentración se muestran en la gráfica 4.15.

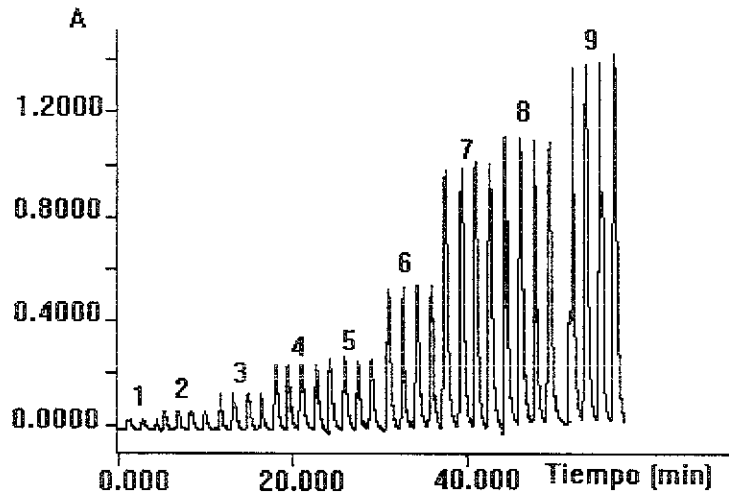
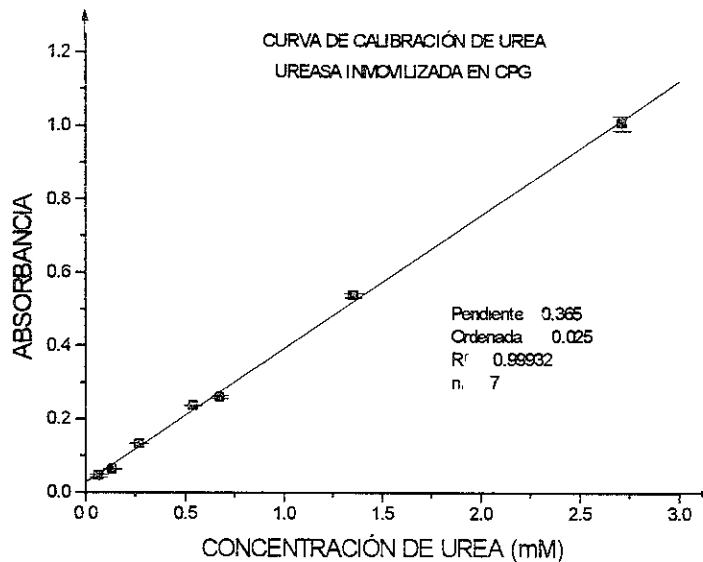


Fig. 4.11. Determinación de urea por FIA. Ureasa inmovilizada en CPG. 1: 0.0625 mM; 2: 0.125 mM; 3: 0.250 mM; 4: 0.5 mM; 5: 0.625 mM; 6: 1.25 mM; 7: 2.5 mM; 8: 5 mM; 9: 10 mM.



Gráfica 4.15. Determinación de urea por FIA. Ureasa inmovilizada en CPG. De los puntos correspondientes a la figura 4.11. únicamente se graficaron los que entran en intervalo lineal.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 4.6. CUADRO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO Y DE UREA. UREASA EN CPG

DETERMINACIÓN	PENDIENTE	R	INTERVALO LINEAL
Amonio	0.214	0.99645	0.2-1.0 mM
Urea	0.365	0.99932	0.0625-2.5 mM

Al analizar los resultados de la tabla 4.6. se observa que en este caso, la pendiente de la recta para la curva de calibración de urea es casi del doble de magnitud de la pendiente de la curva de calibración de amonio (1.7 veces mayor). En este caso, como en el caso de la enzima inmovilizada en alginato, el sustrato atraviesa por el reactor enzimático, que constituye solamente una zona del sistema de transporte, manteniéndose la relación amonio-urea aproximadamente 2:1. La diferencia en esta relación puede traducirse en el grado de conversión enzimática. Si se calcula la eficacia de la reacción enzimática para este sistema, se obtiene un valor de 0.8492 (84.92%).

4.2.3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UREASA

Se empacó la celda de flujo de 1 mm de paso óptico con 7.6 mg de vidrio de poro controlado con la ureasa inmovilizada.

Al inyectar disoluciones de urea de concentraciones 0.06, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.50 mM y detener el flujo según el procedimiento descrito en la sección 3.2.3.2. se obtiene un fiagrama como el que se muestra en la figura 4.12.

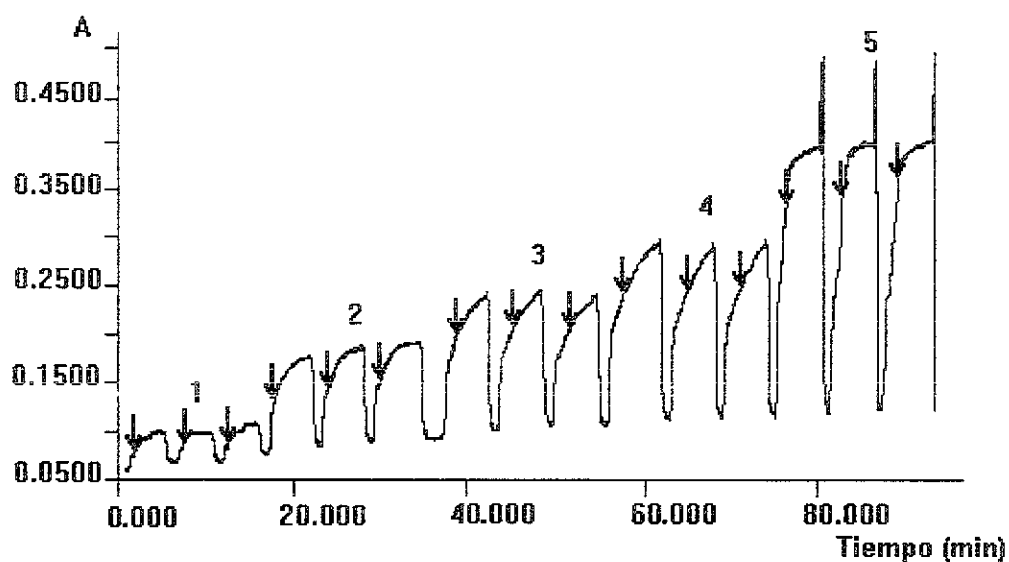
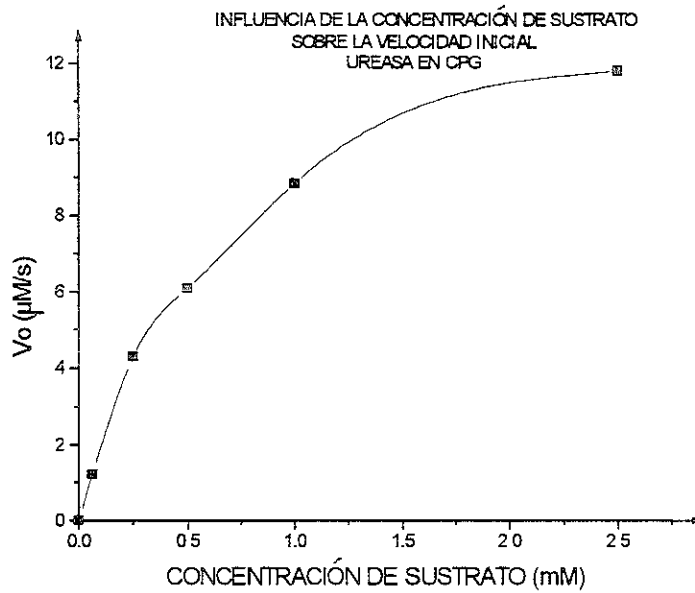


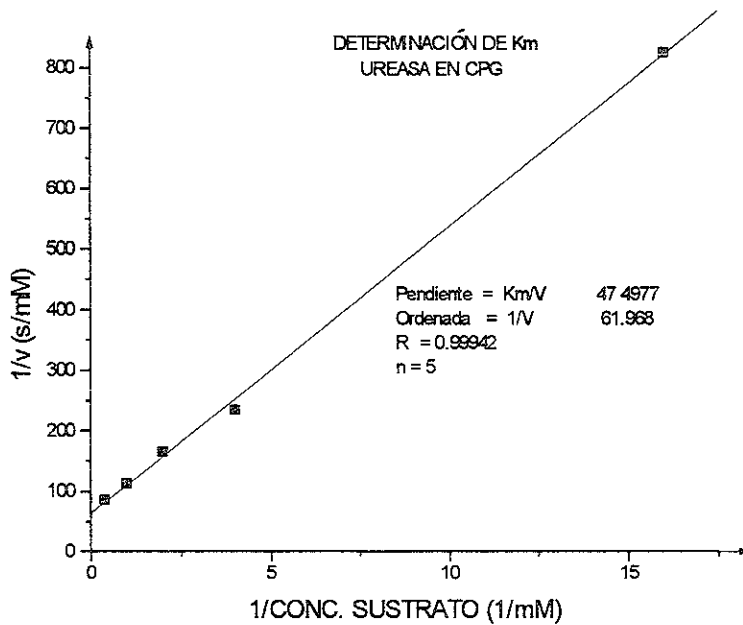
Fig. 4.12. Determinación de la actividad enzimática de la ureasa. Ureasa inmovilizada en CPG. 1: 0.0625 mM; 2: 0.250 mM; 3: 0.500 mM; 4: 1.000 mM; 5: 2.500 mM.

A partir de este diagrama, se tomaron los valores de absorbancia a tiempo fijo (50 segundos), tomando como tiempo inicial el momento de realizar la inyección. Los valores de absorbancia se refirieron en este caso a la curva de calibración de amonio correspondiente a la configuración sin integrar el reactor enzimático, ya que en este caso, el bolo de muestra no sufre dispersión en el sistema de transporte, y se corrigieron por la longitud del paso óptico. Se calculó la velocidad inicial (en $\mu\text{mol/L seg}$) para cada concentración de sustrato. Los resultados de graficar la velocidad inicial en función de la concentración de urea se muestran en la gráfica 4.16.

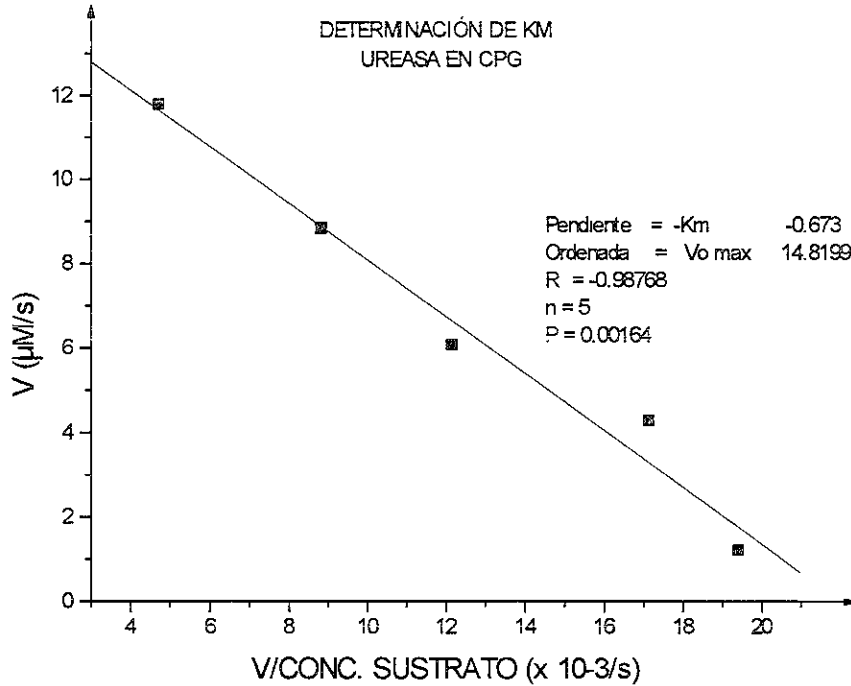


Gráfica 4.16. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad inicial. Ureasa inmovilizada en CPG.

Se realizaron las trasposiciones de Lineweaver y Burke y de Hofstee y Eadie, obteniéndose las gráficas 4.17. y 4.18. respectivamente.



Gráfica 4.17. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Lineweaver y Burke Ureasa inmovilizada en CPG.



Gráfica 4.18. Determinación de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad inicial máxima de la ureasa. Trasposición de Hofstee y Eadie. Ureasa inmovilizada en CPG.

Tomando en cuenta que se utilizaron 7.6 mg de vidrio de poro controlado con ureasa inmovilizada, se calculó la actividad de la enzima por gramo de CPG.

Los valores de los parámetros cinéticos de la ureasa inmovilizada en CPG se encuentran resumidos en la tabla 4.7.

TABLA 4.7. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA UREASA. UREASA INMOVILIZADA EN CPG

	Pendiente	Ordenada al origen	R	$(V_0)_{\text{max}}$ ($\mu\text{mol/L seg}$)	K_M (mM)	Actividad (UI/g)
Lineweaver y Burke	47.4977	61.9679	0.99942	16.1373	0.766	637
Hofstee y Eadie	-0.6733	14.8199	0.98768	14.8199	0.673	585

Como puede observarse al analizar los resultados de la tabla 4.7., en este caso, al realizar la trasposición de Lineweaver y Burke sí se obtiene una recta, con un coeficiente de regresión de 0.99942, debido fundamentalmente a dos razones:

-El diámetro de las esferas de vidrio de poro controlado es mucho menor al de las perlas de alginato y su geometría es más regular, lo cual provoca una menor dispersión del bolo de muestra en el interior del reactor enzimático.

-Al inmovilizar la ureasa en las microesferas de vidrio, ésta se une a la superficie del vidrio, por lo que el sustrato no tiene que difundir al interior de la matriz sólida, y los efectos de difusión son despreciables.

La trasposición de Hofstee y Eadie resulta de multiplicar por $V_o \cdot (V_o)_{\max}$ la trasposición de Lineweaver y Burke. Con esto, se tienen datos experimentales (V_o) de los dos lados de la igualdad, por ello se tiene una mayor dispersión y consecuentemente una menor regresión en el cálculo de la recta.

La actividad obtenida experimentalmente (637 UI/g) es mucho mayor a la actividad calculada si se considera que el total de la enzima quedara inmovilizada en el vidrio (338 UI/g). Esto puede explicarse desde dos puntos de vista:

a) Como se discutió en el capítulo 1, es posible que al inmovilizar la enzima en CPG exista un cambio en la conformación de la enzima, y como consecuencia a este cambio conformacional, la actividad enzimática puede verse modificada.

b) Al inmovilizar la enzima en las esferas de vidrio, existe una gran superficie de contacto ($79 \text{ m}^2/\text{g}$), favoreciendo la reacción enzimática, además de que al utilizar el reactor enzimático en un sistema de flujo continuo aumenta el número de interacciones entre la enzima y el sustrato.

La tabla 4.8. muestra el resumen de los resultados obtenidos para los tres diferentes sistemas en los que se utilizó la ureasa.

TABLA 4.8. RESUMEN DE RESULTADOS

	$(V_o)_{max}$ ($\mu\text{mol/L seg}$)	K_M (mM)	Actividad	% η
Ureasa en disolución. Abierto-cerrado	9.402	0.128	564 IU/L (1689)	54.33
Ureasa en disolución. Flujo detenido	9.816	0.136	589	
Ureasa inmovilizada en alginato	25.912	0.0681	17 IU/g (16.9)	83.30
Ureasa inmovilizada en CPG	16.1373	0.766	637 IU/g (338)	84.92

Nota: los valores entre paréntesis indican la actividad teórica de la enzima.

De los resultados mostrados en la tabla 4.8. pueden hacerse las siguientes observaciones:

- Al utilizar la ureasa en disolución, la actividad enzimática calculada en un sistema de flujo continuo es significativamente menor a la actividad enzimática de la disolución preparada. Esto puede deberse a que al realizar la medición cinética, la dispersión del bolo de muestra en el sistema es considerable, provocando que la disminución en la señal debido a esta dispersión sea mayor que el aumento en la misma debido a la reacción enzimática.
- En el caso de la enzima inmovilizada en alginato el bolo de muestra también sufre dispersión física en el sistema cerrado, sin embargo, al atravesar el reactor empacado con la enzima inmovilizada en alginato, hay un mayor número de

interacciones enzima-sustrato, por lo que la disminución en la señal debida a la dispersión se ve contrarrestada con el aumento en la cantidad de amonio producido en el reactor enzimático.

- Para el sistema enzima-CPG, la medición no se realizó en el sistema abierto-cerrado, sino en flujo detenido utilizando una celda de flujo empacada con la enzima, por esta razón, la dispersión física que sufre el bolo de muestra en la celda es despreciable frente al aumento en la señal debida al avance de la reacción enzimática.

- Al combinar el carácter cinético inherente del FIA con la cinética enzimática no es posible explicar el sistema por medio del modelo simple de Michaelis-Menten.

4.3. INHIBICIÓN DE UREASA POR MERCURIO

4.3.1. Optimización del tiempo de inhibición

Utilizando la configuración mostrada en la figura 3.9. integrando un reactor empacado con ureasa inmovilizada en CPG de 0.11 cm D.I. y 1.0 cm de longitud. Se inyectó una disolución de urea 4 mM y la inhibición de la enzima se realizó con una disolución de Hg (II) de concentración 0.1 ppm, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 4.9.

TABLA 4.9. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INHIBICIÓN

Tiempo de Inhibición	A (blanco)	σ	A (después de inhibición)	ΔA
1 min.	0.3950	0.0213	0.3661	0.0289
2 min.	0.4264	0.0267	0.3880	0.0384
3 min.	0.4381	0.0255	0.3760	0.0621
5 min.	0.4129	0.0154	0.3407	0.0722

4.3.2. Regeneración de la enzima por tiempo

Como se indicó en la sección 3.3.2., para elegir el tiempo óptimo de inhibición debe tomarse en cuenta la sensibilidad y el tiempo de análisis, por esta razón, se estableció el tiempo óptimo de inhibición de la ureasa en tres minutos. Se procedió entonces a optimizar la regeneración de la enzima haciendo pasar por el reactor enzimático una disolución de EDTA 10 mM por ocho minutos, obteniéndose el diagrama que se muestra en la figura 4.13.

Como puede observarse en la figura 4.13., después de hacer pasar la disolución de mercurio 0.1 ppm durante tres minutos, la señal correspondiente a la inyección de urea disminuye, pero no se vuelve a restablecer aún dejando 8 minutos la disolución de EDTA. Asimismo, la señal no disminuye más por inhibición con disolución de mercurio 0.5 ppm.

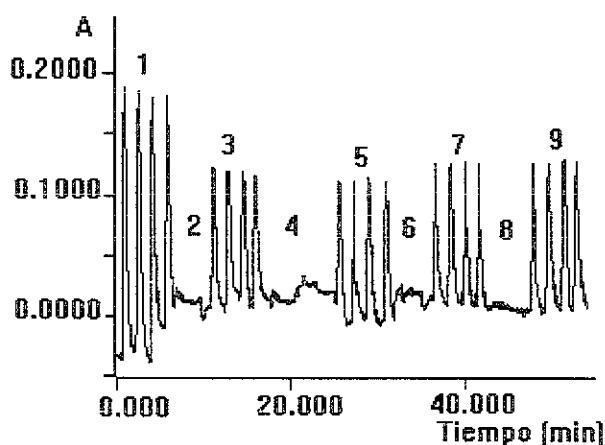


Fig. 4.13. Inyecciones de urea 2.5 mM. 1: señal correspondiente al blanco. 2: Inhibición por Hg (II) 0.1 ppm durante 3 minutos. 3: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 4: Regeneración con EDTA 10 mM por 8 minutos. 5: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la regeneración. 6: Inhibición por Hg (II) 0.5 ppm durante 3 minutos. 7: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 8: Regeneración con EDTA 10 mM por 8 minutos. 9: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la regeneración.

Por esta razón, se procedió a disminuir el tiempo de inhibición a 1 minuto utilizando mercurio 0.2 y 0.4 ppm. Los resultados se muestran en la figura 4.14.

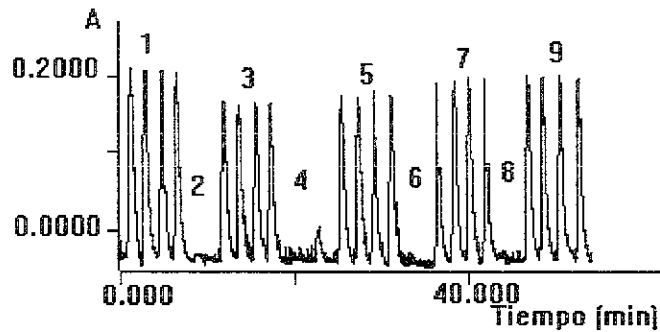


Fig. 4.14. Inyecciones de urea 2.5 mM. 1: señal correspondiente al blanco. 2: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto. 3: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 4: Regeneración con EDTA 10 mM por 3 minutos, 3 minutos de lavado con la disolución portadora de fosfatos. 5: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la regeneración. 6: Inhibición por Hg (II) 0.4 ppm durante 1 minuto. 7: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 8: 5 minutos de lavado con disolución de fosfatos. 9: Inyecciones de urea 2.5 mM después del tiempo de lavado.

En la figura 4.14. se observa que después de hacer pasar la disolución de mercurio 0.2 ppm durante 1 minuto, dejando posteriormente dos minutos de lavado con la disolución portadora de fosfatos, hay un decremento en la señal correspondiente a la inyección de urea. Después de regenerar la enzima con EDTA 10 mM durante 3 minutos, se obtiene el mismo valor de absorbancia que la señal del blanco, pero al inhibir con mercurio 0.4 ppm la señal se mantiene constante, por lo que se dejó pasar la disolución portadora de fosfatos durante 5 minutos, para eliminar el EDTA que hubiera quedado atrapado en los espacios intersticiales del reactor enzimático, sin embargo la señal se mantuvo constante.

4.3.3. Regeneración de la enzima por pulso

Debido a los resultados obtenidos al regenerar la enzima haciendo pasar la disolución de EDTA 10 mM por un tiempo predeterminado, se planteó regenerar la ureasa con una sola inyección de EDTA, de concentración suficiente para que con dicha inyección se restablezca la señal del blanco.

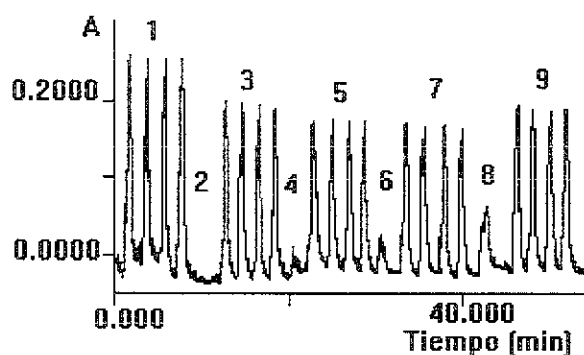


Fig. 4.15. Inyecciones de urea 2.5 mM. 1: Señal correspondiente al blanco. 2: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 3: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 4: Inyección de EDTA 5 mM. 5: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración 6: Inyección de EDTA 10 mM. 7: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración 8: Inyección de EDTA 25 mM. 9: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración.

El diagrama de la figura 4.15. muestra la optimización de la concentración de EDTA para regenerar la enzima. Después de inhibir a la ureasa con la disolución de mercurio 0.2 ppm, se realizaron inyecciones de EDTA en concentraciones 5, 10 y 25 mM. Con esta última disolución se restablece la señal del blanco en un 87.33%, por lo que, con esta disolución, utilizando un nuevo reactor de ureasa, se realizaron alternadamente los procesos de inhibición y regeneración de la enzima, obteniéndose el diagrama que se muestra en la figura 4.16.

Los resultados se resumen en la tabla 4.10.

TABLA 4.10. INHIBICIÓN Y REGENERACIÓN DE UREASA

A	A	ΔA	A	A	ΔA	A	A	ΔA
Blanco 1	Inhib.		Blanco 2	Inhib.		Blanco 3	Inhib.	
0.5857	0.5534	0.0323	0.5312	0.5041	0.0271	0.5309	0.5039	0.0272

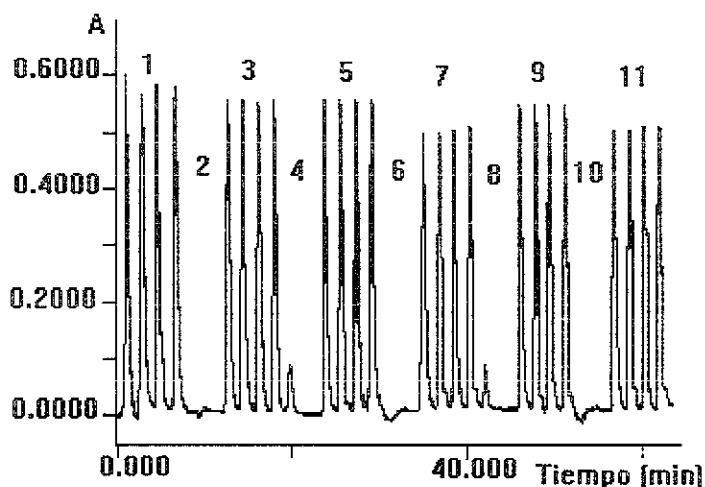


Fig. 4.16. Inyecciones de urea 2.5 mM. 1: señal correspondiente al blanco. 2: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 3: : Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 4: Inyección de EDTA 25 mM, 3 minutos de lavado. 5: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración. 6: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 7: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 8: Inyección de EDTA 25 mM, 3 minutos de lavado. 9: inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración. 10: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 11: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición.

Después de la primera inhibición de la ureasa, la diferencia de absorbancia con respecto al blanco es de 0.0323. Después inyectar el pulso de EDTA, la señal del blanco se restablece en un 90.7%. Después de este primer ciclo de inhibición - regeneración, en los siguientes dos ciclos se observa que tanto la señal del blanco como la diferencia de absorbancias al inhibir la enzima se mantienen constantes.

A continuación se procedió a inhibir la enzima ureasa con disoluciones de mercurio de concentraciones 0.2, 0.5, 0.8 y 1 ppm, seguidas de la correspondiente inyección de regeneración con EDTA, obteniéndose el diagrama que se muestra en la figura 4.17.

La curva de calibración correspondiente se construyó graficando los valores de las diferencias de absorbancia entre las inyecciones de urea con la enzima regenerada y las correspondientes inyecciones después de los ciclos de inhibición.

Los resultados se muestran en la gráfica 4.19.

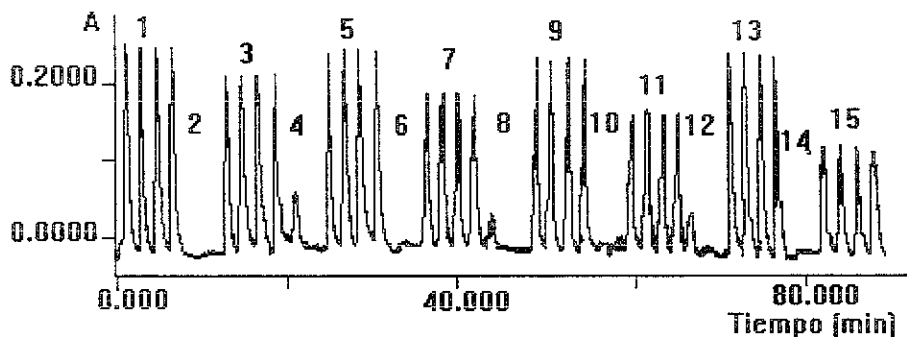
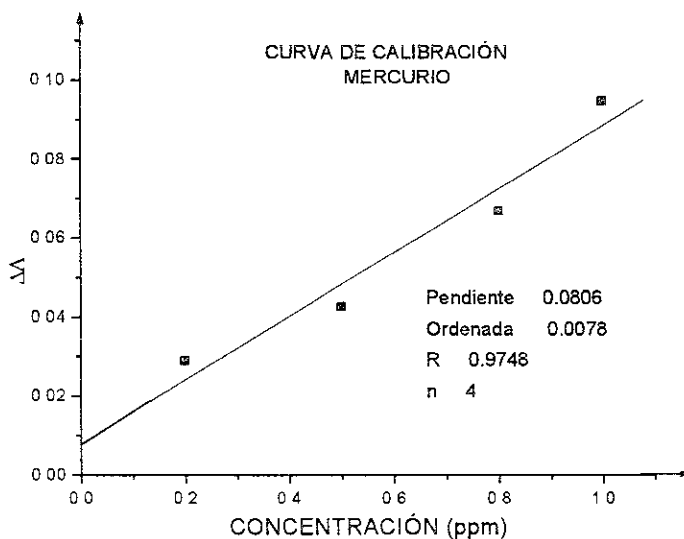


Fig. 4.17. Inyecciones de urea 2.5 mM. 1: señal correspondiente al blanco. 2: Inhibición por Hg (II) 0.2 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 3: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 4: Inyección de EDTA 25 mM, 3 minutos de lavado. 5: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración. 6: Inhibición por Hg (II) 0.5 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 7: inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 8: Inyección de EDTA 25 mM, 3 minutos de lavado. 9: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración. 10: Inhibición por Hg (II) 0.8 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 11: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición. 12: Inyección de EDTA 25 mM, 3 minutos de lavado. 13: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inyección de regeneración. 14: Inhibición por Hg (II) 1.0 ppm durante 1 minuto, 3 minutos de lavado. 15: Inyecciones de urea 2.5 mM después de la inhibición.



Gráfica 4.19. Determinación de mercurio por inhibición de la ureasa

La gráfica 4.19 muestra que es posible utilizar los mecanismos de inhibición-regeneración de la ureasa para la determinación de mercurio, no obstante, para obtener un mejor valor de R es todavía necesario optimizar las diferentes variables, como son el tamaño del reactor, intervalos de concentración de mercurio, etc.

CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo experimental se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- * Es posible incorporar el uso de enzimas a sistemas de flujo continuo para determinaciones analíticas, tanto en disolución como inmovilizadas.
- * Al utilizar la ureasa en disolución, la actividad enzimática calculada en un sistema de flujo continuo es significativamente menor a la actividad enzimática de la disolución preparada. Esto puede deberse a que al realizar la medición cinética en el sistema, la dispersión del bolo de muestra en el sistema es considerable, provocando que la disminución en la señal debido a esta dispersión sea mayor que el aumento en la misma debido a la reacción enzimática.
- * En el caso de la enzima inmovilizada en alginato el bolo de muestra también sufre dispersión física en el sistema cerrado, sin embargo, al atravesar el reactor empacado con la enzima inmovilizada en alginato, hay un mayor número de interacciones enzima-sustrato, por lo que la disminución en la señal debida a la dispersión se ve contrarrestada con el aumento en la cantidad de amonio producido en el reactor enzimático.
- * Al inmovilizar la ureasa en alginato, los efectos de transferencia de masa externa e interna afectan de manera significativa.
- * Para el sistema enzima-CPG se obtiene el mayor incremento en la actividad enzimática por gramo de soporte. Este incremento puede deberse a:
 - Un aumento en el área superficial
 - Un aumento en el número de interacciones entre las moléculas de sustrato y la enzima, lo que se traduce en un aumento de la actividad de la enzima inmovilizada.
 - Al inmovilizar la enzima en una matriz sólida ésta puede sufrir un cambio en su estructura tridimensional, y por lo tanto modificar su actividad.
- * Es posible determinar la concentración de sustancias inhibidoras de enzimas.

- * El ciclo inhibición - regeneración de la ureasa para la determinación de mercurio se logra de manera más adecuada inyectando la disolución regeneradora de EDTA.
- * Es necesario optimizar el método de determinación de mercurio, (intervalos de concentración de mercurio, longitud de reactor enzimático, etc.) para obtener un mejor coeficiente de regresión.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Valcárcel, M. *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992) 814
- (2) Valcárcel, M.; Ríos, A. *Analisis*, 18 (1990) 469
- (3) Ruzicka, J.; Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 78 (1975) 145
- (4) Ruzicka, J.; Hansen, E.H. *Anal Chim. Acta*, 114 (1980) 19
- (5) Ruzicka, J.; Hansen, E.H. *Flow Injection Analysis*. Wiley, New York, 1981
- (6) Ruzicka, J.; Hansen, E.H. *Flow Injection Analysis*. Wiley, New York, 2a. Ed. 1988
- (7) Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 3
- (8) Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D. *Trends Anal. Chem.*, 14 (6) (1995) 242
- (9) Lázaro, F.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta.*, 242 (1991)283
- (10) Luque de Castro, M.D.; Valcárcel *Trends Anal. Chem.*, 11 (4) (1992) 149
- (11) Ögren, L.; Johansson, G. *Anal. Chim. Acta*. 96 (1978) 1
- (12) Thompson, M.; Krull, U.J. *Analytical Chemistry* 63, 7 (1991) 393A
- (13) Gorton, L.; Csöregi, E. et al. *Analytica Chimica Acta* 250 (1991) 203
- (14) Cañizares Macías, M.P. *Desarrollo de sensores y sistemas sensores en configuraciones de flujo no segmentado*. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica. Córdoba, España 1995.
- (15) Hirai, Mitsuhiro; Kawai-Hirai, Rika; Hirai, Toshihiro; Ueki, Tatsuo. *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 55
- (16) Fishbein, William N.; Nagarajan, K.; Scurzi, Warren. *The Journal of Biological Chemistry*. 248, 22 (1973) 7870
- (17) Eichhorn, Gunther L.; Marzilli, Luigi G. (editores) *Advances in Inorganic Biochemistry*. Vol. 6 Elsevier N.York 1984. Cap. 7 *Urea and Urease* por Andrews, Robert K.; Blakeley, Robert L.; Zerner, Burt

- (18) GG Guilbault, *Anal Chem* 42, (1970) 334R
- (19) H.U. Bermeyer, Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. vol. 1-4, Academic, New York, 1975
- (20) Carr, Peter W.; Bowers, Larry D. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, John Wiley & Sons (1980)
- (21) Copeland, Robert A. *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. VCH Publishers Inc. (1996)
- (22) Mottola, H. A. *Kinetic Aspects of Anal. Chem.*, John Wiley & Sons (1988)
- (23) Hasselberger, Francis X. *Uses of enzymes and immobilized enzymes*. Nelson Halt, Chicago (1978)
- (24) O.R. Zaborsky, *Immobilized Enzymes* CRC Press, Cleveland, Ohio, 1973
- (25) Trevan, Michael D. *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology*. John Wiley & Sons. (1980)
- (26) Goldstein, León (editores) *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Vol. 1 Academic Press (1976). Engasser, Jean-Marc; Horvath, Csaba. *Diffusion and Kinetics with Immobilized Enzymes*. Wingard, Lemuel B.; Katchalski-Katzir, Ephraim;
- (27) Goldstein, L. *Biochemistry*, 11, 4072 (1972)
- (28) Dixon, M.; Edwin, W. *Enzymes*. 3th. Ed. Longman Group Limited. London (1979)
- (29) Mildner, P.; Mihanovic, B.; Winterstreiger-Cvoriscec, D. *Croat. Chem. Acta*. 44 (1972) 407
- (30) Andrews, A.T.deB.; Reithel, F.J. *Arch. of Biochemistry and Biophysics*. 141 (1970) 538
- (31) Dixon, N.E.; Gazzola, C.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4131.
- (32) Dixon, N.E.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 469.
- (33) Dixon, N.E.; Gazzola, C.; Asher, C.J.; Lee, D.S.W.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 474.
- (34) Dixon, N.E.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 481

- (35) Dixon, N.E.; Gazzola, C.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Science*. 191 (1976) 1144
- (36) Hirai, Mitsuhiro; Kawai-Hirai, Rika; Hirai, Toshihiro; Ueki, Tatsuo. *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 55.
- (37) Fishbein, William N.; Nagarajan, K.; Scurzi, Warren. *The Journal of Biological Chemistry*. 248, 22 (1973) 7870
- (38) Dixon, N.E.; Riddles, P.W.; Gazzola, C.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 1335; erratum, 59, (1981) 564
- (39) Shaw, William H.R. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 2160
- (40) Shaw, William H.R. Raval, Dilip N. *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3148
- (41) Webb, J.L. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Vol. II. Academic Press, N.Y. & London
- (42) Sundaraman, P.V.; Crook, E.M. *Can. J. Biochem* 49 (1971) 1388
- (43) Gardner, D.L.; Falb, R.D.; Kim, B.C.; Emmerling, D.C. *Trans. Am. Soc. Art. Intern. Organs* 17, (1971) 239
- (44) Alexander, P.W.; Joseph, Jose P. *Analytica Chimica Acta* 131 (1981) 103
- (45) Ianniello, Robert M.; Yacynych, Alexander M. *Analytica Chimica Acta* 146 (1983) 249
- (46) Gilbault, G.G.; Das, J. *Anal. Biochem.* 33 (1970) 341
- (47) Riesel, E.; Katchalski, E. *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1521
- (48) Inman D.J. Hornby, W.E. *Biochem J.* 129 (1972) 225
- (49) Anita, A.; Sastry, C. A.; Hashim, M. A. *Bioprocess Engineering* 17 (1997) 241
- (50) Weetall, H.H.; Hersh, L.S. *Biochim. Biophys. Acta* 185 (1969) 464
- (51) Masoom, M.; Townshend, A. *Anal. Chim Acta.* 166 (1984) 111
- (52) Guilbault, G.G.; Montalvo, J.G. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 8 (1969) 2164
- (53) Eremev, N. L.; Kukhtin, A. V. *Anal. Chim Acta.* 347 (1997) 27
- (54) Arnold, M. A.; Glazier, S. A. *Biotechnology Letters* 6 (5) (1984) 313
- (55) Mascini, M.; Guilbault, G.G. *Analytical Chemistry* 49 (6) (1977) 795
- (56) Cardoso de Faria, L.; Pasquini, C.; de Oliveira Neto, G. *Analyst* 116 (1991) 357
- (57) Godjevargova, Ts.; Dimov, A. *Journal of Membrane Science* 135 (1997) 93

- (58) Koncki, R., Mohr, G. J.; Wolfbeis, O. S. *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995) 653
- (59) Das, N.; Prabhakar, P.; Kayastha, A. M.; Srivastava, R. C. *Biotechnology and Bioengineering* 54 (4) (1997) 329
- (60) Della Ciana, L.; Caputo, G. *Clinical Chemistry* 42 (7) (1996) 1079
- (61) Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; Ghose, A. K.; Mottola, H. A. *Anal. Chem.* 51 (1979) 199
- (62) Johansson, Ögren, L. *Anal. Chim. Acta* 84 (1976) 23
- (63) Taylor, D.; Nieman, T. A. *Anal. Chim. Acta* 186 (1986) 91
- (64) Adams, R.E.; Carr, P.W. *Anal. Chem.* 50, 7 (1978) 944
- (65) Uchiyama, S.; Tohfuku, Y.; Suzuki, S.; Muto, G. *Anal. Chim. Acta* 174 (1985) 313
- (66) Solich P.; Poláček, M.; Karlíček, R.; Valentová, O.; Marek, M. *Anal. Chim. Acta* 218 (1989) 151
- (67) Rocks, B.; Riley, C. *Clin Chem.*, 28 (1982) 409. Riley, C.;
- (68) Rocks, B.; Sherwood, R.A. *Talanta*, 31 (1984) 879.
- (69) Linares, P.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *Rev. Anal. Chem.*, VIII (1985) 229
- (70) Luque de Castro, M.D.; Fernández-Romero, J.M., *Analytical Letters*, 24 (5), (1991) 749.
- (71) Fernández-Romero, J.M.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *Analytical Letters*, 26 (9) (1993) 1847
- (72) Moges, G.; Johansson, G. *Anal Chem.*, 66 (1994) 3834
- (73) Lázaro, F.; Luque de Castro, M.D. Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta*, 185 (1986) 87
- (74) Ríos, A.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *Anal Chem.*, 58 (1986) 663
- (75) Torres, M.T.; Linares, P.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta*, en prensa
- (76) Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D. *Analyst* 115 (1990) 699
- (77) Worsfold, P.J.; Nabi, A., *Anal, Chim. Acta*, 179 (1986) 307

- (78) Nabi, A.; Worsfold, P.J., *Analyst*, 111 (1986)1321
- (79) Pilosof, D.; Nieman, T.A., *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1698
- (80) Yerian, T.D.; Christian, G.D.; Ruzicka, J. *Anal Chim. Acta*, 204 (1988) 7
- (81) Yerian, T.D.; Christian, G.D.; Ruzicka, J. *Anal Chem.*, 60 (1988) 1250
- (82) Trettnak, W.; Leiner, M.J.P.; Wolfbeis, O.S., *Analyst*, 113 (1988) 1519
- (83) Linares, P.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta*, 230 (1990) 199
- (84) Membiela, A.; Lázaro, F.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. *J. Chromatog.*, en prensa
- (85) Takahashi, K.; Taniguchi, S.; Kuroishi, T.; Yasuda, K.; Sano, T. *Anal. Chim. Acta*, 220 (1989) 13
- (86) Rocks, B.; Sherwood, R.A.; Hosseinmardi, M.M.; Riley, C. *Anal. Chim Acta*, 179 (1986) 225
- (87) Luque de Castro, M.D.; Fernández-Romero, J.M. *Analytical Letters*, 24 (5) (1991) 749
- (88) Fernández-Romero, J.M.; Luque de Castro, M.D. *Anal. Chim. Acta*, 219 (1989) 191
- (89) Fernández-Romero.; Luque de Castro, M.D. *Clin. Chem.* 41 (1) (1995)99
- (90) Johansson, G.; Ögren, L.; Olsson, B. *Analytica Chimica Acta*, 145 (1983) 71
- (91) Goldstein, L. en Mosbach, K (Ed.) *Methods in Enzymology, Vol. XLIV, Immobilized Enzymes*. Academic Press, New York, (1976), p. 397
- (92) Giddings, J.C. *Anal. Chem.* 35, 10 (1963) 1963
- (93) Knox, J.H.; Parcher, J.F. *Anal. Chem.* 41, 12 (1969) 1500
- (94) Huber, J.F.K.; Jonker, K.M.; Poppe, H. *Anal. Chem.* 52 (1980) 2
- (95) Knox, J.H. *Anal. Chem.* 38, 2 (1966) 253
- (96) Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E.; Trussell, E.E. editores. *Standard Methods for the determination of Water and Wastewater*. 17a. ed. USA 1989
- (97) Kaplan, A.; Teng, Ling-Nar L. *Stand. Methods Clin. Chem.* 5 (1965) 357
- (98) Bryce, D.W.; Fernández-Romero, J.M.; Luque de Castro, M.D. *Analytical Letters*, 27 (5) (1994) 867