

# DETERMINACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO MEDIANTE REACCION QUIMIOLUMINISCENTE CON LUMINOL. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCION

M. Borrajero, N. Ugarova, E. Perera y C. Pascual,

Dpto. Diagnostico y Bioquímica Clínica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

**RESUMEN.** Durante la reacción quimioluminiscente en presencia de luminol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) y p-iodofenol (20  $\mu\text{mol/L}$ ) se observa un comportamiento cinético no lineal y no hiperbólico con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno, entre 0,5 y 5  $\mu\text{mol/L}$  a pH 8 (amortiguador Tris-HCL). Mediante el ploteo de la raíz cuadrada de la intensidad de la señal luminiscente vs concentración de peróxido se lineariza la dependencia, lo cual resulta de utilidad para su empleo como curva de calibración para la detección de peróxido. El p-iodofenol, empleado como facilitador de la reacción, resulta inhibitorio a concentraciones por encima de 20  $\text{mol/L}$ .

**ABSTRACT.** A non-linear and non-hyperbolic kinetic behavior is observed when hydrogen peroxide (concentration range of 0,5 to 5  $\mu\text{mol/L}$ ) is used in the chemiluminescent reaction in presence of 50  $\mu\text{mol/L}$  luminol and 20  $\mu\text{mol/L}$  p-iodophenol in Tris buffer at pH 8,0. Linearization, which could be useful for calibration of hydrogen peroxide determination, can be achieved by plotting the square root of the light intensity values vs. the concentration of peroxide. p-iodophenol which is used as an enhancer of the chemiluminescent reaction caused inhibition of the light intensity when employed at concentrations above 20  $\text{mol/L}$ .

## INTRODUCCION

Las reacciones quimioluminiscentes se emplean en la determinación de radicales de oxígeno de diversos tipos, involucrados en importantes procesos tales como fagocitosis<sup>1,2</sup> y peroxidaciones lipídicas<sup>3</sup>. Estos métodos de detección luminiscentes son de alta sensibilidad y son también muy usados en técnicas como el inmunoensayo dependiente de peroxidasa<sup>4</sup>, realizándose la detección a través del empleo de tubo fotomultiplicador, fotodiodo o película fotográfica instantánea<sup>5-7</sup>. Los métodos quimioluminiscentes mediados por luminol se basan en la detección de luz emitida a 425 nm durante la reacción de la enzima peroxidasa sobre peróxido de hidrógeno, en presencia de luminol y p-iodo fenol. Este último (así como otros derivados del fenol) amplifica la emisión de luz en varios órdenes de magnitud.

Existen muchas enzimas (colesterol oxidasa, glucosa oxidasa, aminoácido oxidasa, etc.) cuyos sustratos son metabolitos de interés para fines diagnósticos y que son productoras de peróxido. Por ello resulta de interés la detección de peróxido por ésta vía.

En éste trabajo se estudia el efecto de los distintos componentes de la reacción (luminol, p-iodo fenol, peróxido y peroxidasa) sobre la emisión de la señal quimioluminiscente.

## MATERIALES Y METODOS

**Reactivos:** Luminol (SIGMA), peroxidasa de rábano (Boehringer Mannheim), peróxido de hidrógeno (BDH) y p-iodofenol (Aldrich).

### Procedimiento

La enzima se disolvió en amortiguador fosfato 10  $\mu\text{mol/L}$  pH 8,0  $\text{KNO}_3$  100  $\mu\text{mol/L}$ . La concentración de enzima se ajustó a través de la absorbancia a 403 nm. Las determinaciones se realizaron en un volumen total de 1 ml en amortiguador Tris 100  $\text{mol/L}$  pH 8,0 empleando un fluorímetro (Corning Eel) acoplado a un registrador (LKB 2210 Recorder). Como norma se añadió el peróxido en último término (desencadenante de la reacción) aunque el orden de adición no influye sobre la señal. La señal quimioluminiscente se evalúa en términos de altura del pico trazado por el registrador. Se evaluaron distintas concentraciones en la mezcla de reacción de diversos componentes, haciendo variar la concentración de uno solo en cada juego de experimentos. Se realizaron 4 réplicas de cada experiencia.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto del luminol y el p-iodo fenol sobre la emisión de luz.

En la Figura 1 se observa la dependencia entre la concentración de p-iodo fenol y la señal emitida a concentraciones fijas de peróxido

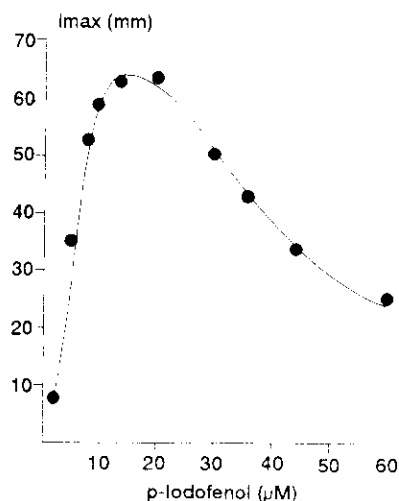


Fig. 1 Efecto de la concentración de p-iodo fenol sobre la intensidad de la señal quimioluminiscente medida

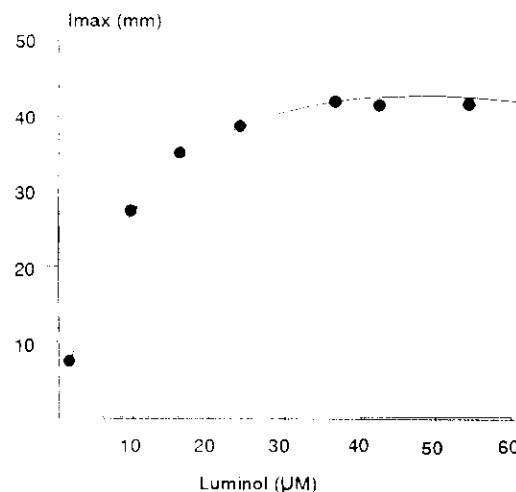


Fig. 2 Efecto de la concentración de luminol sobre la intensidad de la señal quimioluminiscente medida como

(6  $\mu\text{mol/L}$ ), luminol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) y peroxidasa (5  $\text{nmol/L}$ ) en la mezcla de reacción. Entre 15 y 20  $\mu\text{mol/L}$  de p-iodo fenol se observa la mayor contribución a la señal. Por encima de éstos valores de concentración aparece un efecto inhibitorio que es preciso tener en cuenta a la hora de optimizar las condiciones de la reacción.

En la Figura 2 se observa la dependencia entre la cantidad de luminol y la magnitud de la señal, donde aparece un efecto de saturación por encima de 40  $\mu\text{mol/L}$ , a concentración fija del resto de los componentes (peróxido 6  $\mu\text{mol/L}$ , peroxidasa 6  $\mu\text{mol/L}$  y p-iodo fenol 20  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### Efecto de la concentración de enzima:

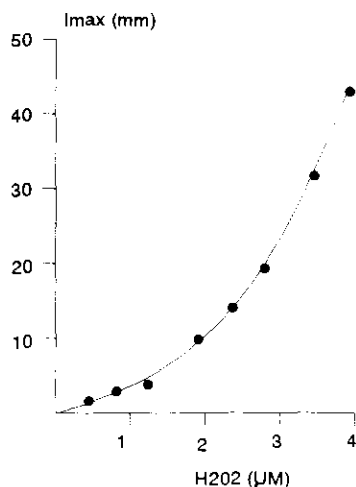
La dependencia entre la concentración de enzima y la señal luminiscente es lineal entre 5 y 20  $\text{nmol/L}$  en la mezcla. Los datos en éste rango se ajustan a la ecuación  $Y = 111,1X$  donde Y es el valor de intensidad de la señal (altura en mm) y X la concentración de enzima ( $\text{nmol/L}$ ) ( $r = 0,99$ ). Por encima de 20  $\text{nmol/L}$  de peroxidasa la emisión de luz es tan rápida que se pierde una parte de la señal. Por debajo de 5  $\text{nmol/L}$  la reacción es lenta y la forma del pico cambia, acortándose y ensanchándose en la base.

Este comportamiento resultó útil para comprobar que el efecto inhibitorio del p-iodo fenol es un fenómeno real y no provocado por pérdida de la señal. Tanto la altura del pico como el área bajo la curva resultaron disminuidos. Debe tenerse en cuenta que la altura del pico es una medida de la intensidad de luz emitida, vista como número de cuantos por unidad de tiempo (velocidad de la reacción). El área bajo la curva en cambio es una medida de la cantidad de sustrato transformado.

La relación entre éstos dos parámetros dependerá de las condiciones específicas de la determinación.

#### Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno:

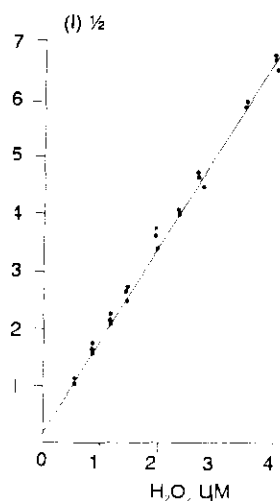
En la Figura 3 se observa la dependencia entre la concentración de peróxido en la mezcla y la magnitud de la señal a concentraciones fijas de p-iodo fenol (20  $\mu\text{mol/L}$ ), peroxidasa (6  $\mu\text{mol/L}$ ) y luminol (50  $\mu\text{mol/L}$ ) en la mezcla. Se obtiene un comportamiento no hiperbólico que puede ser linearizado mediante el cálculo de los logaritmos de concentración y de intensidad de señal. La línea recta que se obtiene obedece a la ecuación  $Y = 1,389 X + 0,18$ , con un coeficiente



**Fig.3 Efecto de la concentración de peróxido sobre la intensidad de la señal quimioluminiscente medida como altura del pico en mm**

de correlación de 0,996.

La dependencia entre la intensidad de la señal (I) y la cantidad de peróxido se ajusta asimismo a la ecuación  $I = k \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^2$ , donde k es una constante. La transformación de ésta función a una línea recta se puede obtener considerando  $[\text{H}_2\text{O}_2]^2$  como X y se obtiene la ecuación  $I = 1,82 X + 0,182$  ( $r = 0,997$ ), la cual puede servir como



**Fig. 4 Ploteo linearizado de la raíz cuadrada de las unidades de intensidad de señal en mm vs. concentraciones respectivas de peróxido ( $\mu\text{mol/L}$ )**

recta de calibración para la detección de peróxido a partir del valor de intensidad de señal (Figura 4).

La emisión de luz con que transcurre ésta reacción es resultado de la formación e interacción de radicales libres, bien sea directamente entre las especies reaccionantes o a través de la formación de radicales hidroxilo o superóxido<sup>8</sup>. El espectro de emisión que reportan Thorpe y cols.<sup>9</sup> durante las reacciones amplificadas y no amplificadas es muy semejante, lo cual sugiere que el p-iodo fenol no sustituye al luminol como generador más eficiente de luz, sino que ejerce su acción facilitadora sobre los reaccionantes. El comportamiento no hiperbólico que se observa con relación al peróxido puede ser resultado además de la reacción enzimática, de otras interacciones de tipo química entre reaccionantes y/o intermediarios. Los resultados obtenidos brindan información acerca de las condiciones en que ocurre la reacción y resultan de utilidad en relación a la estandarización de la detección de peróxido por ésta vía.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo información experimental acerca de las condiciones óptimas e interrelación entre los componentes involucrados en la reacción, todo lo cual resulta de utilidad para la aplicación de los métodos quimioluminiscentes.

## BIBLIOGRAFIA

- Ernst M., Heberer M., Fischer H.J. *Clin. Chem Clin. Biochem.* 21, 550, 1983.
- Storch J., Ferber E. *Anal. Biochem.* 169, 262, 1988.
- Stabler T. V., Siegel A.L. *Clin. Chem.* 36, 906, 1990.
- Iwaoka T., Tabata F., Takahashi T. *Free Radical Biol. and Medicine* 3, 329, 1987.
- Kricka L.J., Thorpe G.H.G. In: *Enhanced luminescence. A practical immunoassay system.* Vol 18, 1-3. Medicine Publishing Foundation Symposium Series, 1986.
- Thorpe G.H.G., Whitehead T.P., Penn R., Kricka L.J. *Clin. Chem.* 30, 806, 1984.
- Wang H.W., Hall J.C., Thorpe G.H.G., Nickles G.G., George J., Kricka L. *J. Lab. Sciences* 43, 145, 1986.
- Wilhem J., Vilim V. *Anal. Biochem.* 158, 201, 1986.
- Thorpe G.H.G., Kricka L.J., Mosley S.B., Whitehead T.P. *Clin. Chem.* 31, 1335, 1985.