



ESTANDARIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRAHEMÁTICA DE LA ENZIMA CATALASA, MEDIANTE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PEROXOMOLÍBDICOS

Autores: Ahmed Amaury Ruiz Moré¹, María de los Angeles Boffill Cárdenas², Deodelsy Bermúdez Toledo³, Lidia González Méndez⁴, Elena Carvajal Ciomina⁵, Isabel De Armas Fernández⁶.

¹ Máster en Bioquímica, Unidad de Investigaciones Biomédicas; ² Dra. Ciencias Médicas, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas; ³ Máster en Bioquímica, Unidad de Toxicología Experimental; ⁴ Especialista de Segundo Grado Farmacología, Unidad de Investigaciones Biomédicas; ⁵ Licenciada en Biología, Unidad de Investigaciones Biomédicas; ⁶ Licenciada en Farmacia, Unidad de Investigaciones Biomédicas.

Universidad de Ciencias Médicas, Villa Clara

ahmed74@nauta.cu

Resumen

La catalasa es una metaloenzima hemínica que transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua, productos de reacción inocuos para la célula. Esto hace que dicha enzima participe en mecanismos celulares y sistémicos relacionados con el estrés oxidativo. Suele encontrarse a lo largo de todo el árbol filogenético, de ahí sus amplias aplicaciones. Existen múltiples métodos de ensayo descritos para la catalasa aunque su implementación para medir su actividad intrahemática tiene el inconveniente de las interferencias debidas a la hemoglobina. La actual investigación pretende demostrar la veracidad analítica de un ensayo para medir actividad catalásica en hemolisados, mediante la formación de complejos peroxomolíbdicos al reaccionar el peróxido de hidrógeno remanente con el molibdato de amonio. Para ello se determinaron condiciones óptimas relacionadas con: longitud de onda del ensayo, tiempo de reacción, concentración de sustrato y concentración de enzima. Se determinaron además parámetros de precisión, exactitud y crioestabilidad relacionados con los hemolisados. Todos los parámetros analizados son congruentes con los preceptos relacionados con la calidad de los

ensayos enzimáticos y la validación de métodos de análisis químico, lo cual permite corroborar la veracidad del sistema analítico propuesto.

Introducción

La catalasa ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxido-reductasa, EC 1.11.1.6) es una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno tanto como donador como aceptor de electrones formando oxígeno y agua.¹ La enzima está presente en toda la escala filogenética, desde microorganismos, plantas y animales. Ésta enzima juega un rol fundamental en la reducción de la toxicidad en la célula producida por peróxido de hidrógeno, por su capacidad de transformarlo en los compuestos químicos mencionados.²

Es una metalo-enzima que presenta un grupo hemo en su centro activo, que le permite catalizar la siguiente reacción:



La determinación de catalasa es muy importante tanto en plantas como en animales.^{3,4} Los procesos metabólicos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis inevitablemente llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. En plantas, bajo condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la producción y la remoción de EROs puede ser perturbado por factores de estrés abióticos tales como alta luminosidad, sequía, bajas y altas temperaturas y estrés mecánico, dando como resultado el aumento en el nivel intracelular de EROs.⁵ Las plantas han desarrollado varias estrategias antioxidantes para eliminar estos compuestos tóxicos. Dentro de éstas podemos citar los mecanismos celulares, para inhibir la acumulación de EROs. Por ejemplo, adaptaciones anatómicas, desarrollo de epidermis refractaria, adaptaciones fisiológicas y moleculares, moléculas antioxidantes, enzimas y otros sistemas más complejos. El aumento de las defensas antioxidantes en plantas, puede aumentar la tolerancia a diferentes factores de estrés.⁶

En animales con sangre roja, incluido el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y ciertos tipos de cáncer. Las mutaciones en el gen de la catalasa pueden resultar en la enfermedad hereditaria denominada acatalasemia que entre otros síntomas se reconoce por un incremento en la incidencia de ulceraciones bucales.⁷

Varios son los métodos empleados para medir la actividad catalasa. El más común involucra la medida de la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno a una λ de 240 nm.⁸ Otros métodos se han dividido en dos categorías. El primero incluye ensayos clásicos como la titulación iodimétrica de Dille y Watkins,⁹ el uso de perborato de sodio como fuente de peróxido,¹⁰ la determinación de peróxido remanente con dicromato en ácido acético que mediante calentamiento forma acetato crómico medido espectrofotométricamente a 570-610 nm,¹¹ o con molibdato de amonio que forma un complejo amarillo, medido a 405 nm¹² o 410 nm,¹³ y diferentes métodos que emplean titulación con permanganato.^{14,15,16} Estos tipos de ensayos tienen la desventaja de no permitir la medición de bajos niveles de catalasa. La segunda categoría de ensayos incluye dos métodos. El primero está basado en el acoplamiento del sistema hidrazida del ácido isonicotínico-pirocatecol¹⁷ y el segundo un método amperométrico donde la catalasa se inmoviliza sobre un electrodo de carbono con nanopartículas de oro electroquímicamente depositadas sobre una capa de nanotubos de carbono/quitosano.¹⁸ Las desventajas de estos métodos radica en la imposibilidad de alcance por la mayoría de los laboratorios. En este estudio un simple, rápido y preciso método colorimétrico para la actividad catalasa es descrito.

Un método bastante sencillo es el que acopla la cantidad de peróxido de hidrógeno residual a la reacción con molibdato de amonio, el cual cumple con dos funciones: una, la detención de la reacción enzimática; la otra, que se forma un complejo coloreado peroxianiónico llamado peroxomolibdico.

En el presente estudio se tomaron como referencia las propuestas analíticas de Hussein,⁴ Goht¹² y Korolyuk,¹³ partiendo del análisis y verificación de las mismas, lo cual es sugerente a realizar algunas modificaciones que se ajusten a las muestras de ensayo en hematíes sanguíneos y el resto del sistema analítico que incluye: las concentraciones de peróxido inicial y remanente, la absorción de los peroxocomplejos formados, así como el tiempo y la temperatura del ensayo.

El grupo de trabajo inNOVAcEnz, radicado en la Universidad Médica de Villa Clara busca ampliar las investigaciones biomédicas (fundamentalmente sobre biomarcadores de cáncer y neumopatías) a los sectores agroalimentarios, del saneamiento ambiental y la industria de los materiales de la construcción, mediante la aplicación de enzimas. La catalasa es un interesante centro de atención por sus aplicaciones versátiles. Pero existe el inconveniente que un método no suele ser aplicable a cualquier matriz donde se halle la enzima, para lo cual es loable contar

con una variedad de ellos. De ahí que se decida ofrecer una metodología que permite evaluar la eficacia y veracidad de la determinación de la enzima catalasa en muestras de contenido intrahemático, eliminando un grupo de interferencias.

Materiales y métodos

Reactivos:

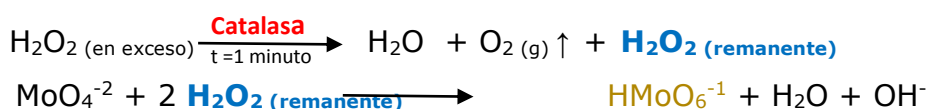
- Buffer fosfato 50 mM, pH=7,4.
- Soluciones sustrato de peróxido de hidrógeno: tomar 40 uL de H₂O₂ al 30% y disolverlo en 25 mL del buffer fosfato. Leer a 240 nm contra blanco de buffer. Tomar en cuenta un coeficiente de extinción molar (ϵ) para el H₂O₂ a 240 nm de 43.6 M⁻¹ cm⁻¹. Aplicando la expresión: $c = \frac{DO}{\epsilon}$ se halla la concentración molar del frasco de peróxido originario, teniendo en cuenta la dilución aplicada al inicio. A partir de éste valor de concentración se preparan las diversas concentraciones en el buffer fosfato 50 mM, pH 7,4. Éste procedimiento debe realizarse cada día que se realice la experiencia pues el peróxido se descompone con relativa facilidad.
- Molibdato de amonio (32,4 mM)
- Catalasa (Sigma) Actividad específica 2525 U/mg. Se pesan 10 mg del liofilizado y se diluyen en 10 mL de buffer fosfato 50 mM, pH=7.0, quedando la solución con una actividad de 2525 kU/L. Dicha actividad se corrobora empleando el método del dicromato documentado previamente por Sinha¹¹ y modificado por Hadwan.^{19,20} Por diluciones sucesivas con dicho buffer se preparan varios patrones de Catalasa purificada con actividades en el rango de 5-160 kU/L.
- Ioduro de potasio (5 %)
- Ácido sulfúrico (10 %)
- Ácido molíbdico, solución saturada. Tomar 50 mL de agua destilada tibia e ir añadiendo pequeñas porciones de ácido molíbdico. Agitar vigorosamente mientras se añade hasta la inadmisión de más soluto. Dejar enfriar y filtrar en lana de vidrio.
- Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃*5H₂O) (0,005 N). La concentración de esta solución no es exacta por lo que debe titularse por triplicado, previo a su empleo, con un patrón primario.
- Almidón soluble (indicador de la titulación): pesar 0,5 g de almidón soluble y se tritura con varios mL de agua fría. Se obtiene una pasta que se vierte en 100 mL de agua hirviendo, prosiguiendo la ebullición algunos minutos hasta que la solución

quede transparente. Dejar enfriar para que el almidón en exceso sedimente. Para usarlo tomar sólo del líquido sobrenadante.

Muestras de ensayo:

- Sangre total anticoagulada con heparina sódica. Se obtiene por venopunción.
- Hemolisado de hematíes: se obtuvo de sangre anticoagulada con heparina, la cual se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. Se realizaron tres lavados con solución salina fisiológica y a la masa de glóbulos resultante se le realizó una dilución 1:5 con agua destilada para la ejecución de tres ciclos de shock térmico entre -70°C y 25°C para conseguir la hemólisis. Pasado esto se centrifugó a 5000 rpm y se tomó el sobrenadante, que se dispensarizó en varias alícuotas. Las que no se emplearon en el momento se conservaron a -70°C.

Fundamento del método:



El procedimiento analítico se presenta en la Tabla 1.

Es válido aclarar que para cada serie de trabajo los tubos PT y BP son comunes para los cálculos de todas las muestras procesadas en dicha serie.

Cálculo de la Actividad Enzimática (AE) Catalasa:

$$\text{AE (kU/L)} = \frac{2,303}{t} * \log \frac{\text{DO(PT)} - \text{DO(BP)}}{\text{DO(M)} - \text{DO(BM)}} * \frac{Vt}{Vm} * Fd$$

Para la estandarización de las muestras de hemolisados, a la sangre total se le realiza la concentración de Hb por el método de la Cianometahemoglobina; el resultado fue expresado en g/L. Cada resultado de AE será dividido por su respectiva concentración hemoglobínica.

Diseño experimental:

Para la adecuada selección de la longitud de onda en la formación de complejos peroxomolibdicos, en función de las concentraciones de peróxido de hidrógeno se toman concentraciones entre 5-35 mM y son adicionadas a la concentración prefijada de molibdato de amonio 32,4 mM. Estas se leen espectrofotométricamente a diferentes longitudes de onda (370, 380, 390, 400 y 410 nm). Se realiza una

selección de aquellas longitudes de onda más adecuadas. Para cada una de ellas se traza la línea recta de mejor ajuste y se obtienen sus ecuaciones y sus respectivos coeficientes de correlación.

Para corroborar gráficamente la cinética de reacción de primer orden se realiza el procedimiento analítico propuesto a los patrones de catalasa purificada, en lugar de las muestras, y se plotean sus actividades enzimáticas con sus respectivos valores de absorbancia, a la longitud de onda seleccionada. Se busca la curva de mejor ajuste y se determina su ecuación matemática.

Para la selección del tiempo de reacción se prepara un pool de hemolisados procedentes de muestras de sangre de diferentes pacientes. Se le realiza la determinación propuesta variando únicamente el tiempo de incubación con el peróxido, desde los 15 segundos hasta los 7 minutos. Se hace una representación gráfica de los valores de absorbancia y los niveles de actividad calculada, en función del tiempo.

Para comprobar el rango de concentraciones relativas de hemoglobina y eliminar sus interferencias se realizaron diluciones de los hemolisados con agua destilada desde 1:60 hasta 1:1200.

El estudio de la precisión intra-corrída requirió tomar 20 alícuotas del pool de hemolisados a una dilución 1:120 y se les aplicó el procedimiento analítico propuesto. La precisión inter-corrída fue realizada de forma similar sólo que las 20 alícuotas procedentes del pool de hemolisado, fueron las almacenadas a -70°C y cada una procedente de copillas diferentes, para lo cual se extrajeron 2 cada día y procesadas en momentos diferentes.

A los resultados de AE, para cada tipo de precisión analizada, se les determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Para analizar la exactitud del método propuesto se realizó la comparación con los métodos de Aebi ⁸ y el de Sumner y Dounce, modificado a partir de Jolles.²¹

Para realizar un análisis de la crioestabilidad de la catalasa en los hemolisados el pool de hemolisado 1:120 fue conservado en congelación a -8 °C y -70 °C. Cada tres días fue extraída una copilla de cada condición y practicado el ensayo propuesto. Los valores de AE fueron determinados durante 2 meses.

Resultados y discusión

El procedimiento propuesto para la determinación de catalasa en hemolisados presenta algunas modificaciones respecto al aplicado a muestras de suero o plasma

debidos a características matriciales específicas del primero. Además, existe otro grupo de modificaciones respecto a los métodos de Góth¹² y Hussein,⁴ las mezclas de reacción correspondientes a los tubos control test (C) y blanco (B), en lugar de agua destilada se les adicionó buffer fosfato, que tiene a su cargo simular de mejor modo la adición del sustrato peróxido diluido en el buffer fosfato, que por demás se plantea modifica la actividad catalasa; además se encarga de restar las interferencias por aminoácidos y proteínas en su reacción con el molibdato. Los mencionados investigadores proponen una longitud de onda de 374 nm pero en nuestro medio fue de 400 nm, justificado en lo adelante.

Los buffer empleados tuvieron diferencias en la fuerza iónica aplicada, siendo de 67 mM; de 50 mM para nuestras propuestas.

Además, debido a las complejidades de la muestra, por la presencia de hemoglobina, con cierta actividad peroxidasa y las posibilidades del hierro hemínico de catalizar ciertas reacciones redox; la alta actividad catalasa dentro del hematíe, se decidió analizar en las diferentes diluciones del hemolisado originario todas las interferencias asociadas a la muestra y al método en sí.

La concentración de peróxido en el sistema analítico propuesto para la catalasa es de 21,2 mM, lo cual apunta las longitudes de onda entre 390-410 nm, siendo en la primera un valor elevado de absorbancia con desviaciones del carácter lineal. Lo anterior se evidencia en la figura 1, donde se muestra la variación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda, en función de la concentración de peróxido en mezcla de reacción.

A 370 nm y 380 nm la sensibilidad es alta, pero sólo es válido para concentraciones de peróxido inferiores a 10 mM y 15 mM, respectivamente, los cuales no serían saturantes para las condiciones restantes del sistema de ensayo enzimático.

Lo anterior da lugar a la selección de las que ofrecieron mejores resultados, con ciertas modificaciones.

En la figura 2 se muestra la absorbancia de los complejos peroxomolibdicos formados a concentraciones de peróxido de hidrógeno añadido entre 5-35 mM, a concentraciones fijas de molibdato de amonio de 32,4 mM. Fueron variadas las longitudes de onda de las lecturas. Se observa valores adecuados en el coeficiente de correlación para todo el rango de concentraciones de peróxido, cuando se mide la absorción de los complejos a 400 nm, no obstante, a pesar de tener mayor sensibilidad a 390 nm, el rango se estrecha a 25 mM y a 378 nm las concentraciones de 5-10 mM no muestran una linealidad adecuada.

Al calcular las absorptividades molares de los complejos peroxomolibdicos a los 378 nm, 390 nm y 400 nm, se obtuvieron los siguientes valores: 293, 96 y 56 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Cuando comparamos estos con lo reportado por Chai y colaboradores²² cuyo valor estimado de 400 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, se correspondió a una longitud de onda de 350 nm, algo menor que la del presente trabajo, pero con mayor sensibilidad como plantearan los mismos autores.

El análisis del comportamiento cinético de la reacción en las condiciones de ensayo que se proponen es fundamental. La figura 3 muestra la relación entre la intensidad de la formación de complejos peroxomolibdicos en función de la actividad de la enzima pura a 1 y 2 minutos de reacción.

Al analizar ambas curvas es evidente como ante cualquier actividad de la enzima pura pasados dos minutos de la reacción el consumo de peróxido es elevado, por lo que se corre el riesgo que no se encuentre a concentraciones saturantes para la enzima y sea esto limitante para la formación de los peroxocomplejos con el molibdato.

Se aprecia una dependencia exponencial tomando como variable dependiente la absorbancia del peroxomolibdato formado; y una relación logarítmica cuando la variable dependiente es la actividad enzimática catalasa. Esto queda demostrado matemáticamente en el gráfico que sigue donde vemos un comportamiento lineal cuando se emplea un sistema de ejes semilogarítmico, donde las ordenadas se corresponden con el $\log(\text{Abs}_{400\text{ nm}})$ (Figura 4).

Al hallar el recobrado, medido como %R, entre las actividades enzimáticas asignadas a cada uno de los patrones de catalasa preparados, y los valores obtenidos por la ecuación matemática propuesta, es evidente la adecuada exactitud. Lo anterior corrobora la certeza en el empleo de una función logarítmica en función de las absorbancias, como una estimación de la actividad de la enzima, como plantearan todos las referencias analizadas.^{4,12,13}

La figura 5 muestra las variaciones de la absorbancia y la actividad enzimática respecto al tiempo de incubación. La variación de absorbancia de los complejos peroxomolibdato formados por un pool de hemolisados (N=10) diluidos 1:120, desde los 15 segundos hasta los 7 minutos se muestra en la figura a la izquierda. Convirtiendo lo anterior en unidades de actividad enzimática por la ecuación propuesta se observa un comportamiento lineal hasta los 5 minutos, pero en el actual estudio se decidió tomar 1 minuto para detener la reacción con la adición del molibdato de amonio, para minimizar el riesgo de inactivar la enzima.

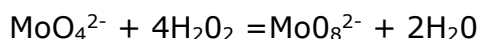
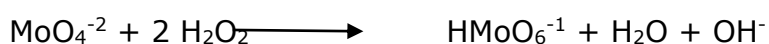
Una medida del efecto de la concentración de enzimas en una muestra se obtiene de forma relativa mediante comparaciones de diferentes diluciones practicadas a una muestra o un pool de la misma, tomado como referencia. La actividad catalasa a diferentes diluciones de la enzima en el pool de hemolisado variando las concentraciones de peróxido se aprecia en la figura 6.

Si analizamos el gráfico anterior son evidentes los sesgos inherentes para las concentraciones de peróxido de 30 mM y 60 mM cuando se extrapolan sus rectas de mejor ajuste al eje de las actividades enzimáticas (eje de las ordenadas); además ambas tienen menores pendientes respecto a la de 40 mM, que por demás guarda una relación directamente proporcional a la concentración de enzima (factor de dilución del hemolisado) y se aproxima a la relación 2:1 propuesta para la reacción.

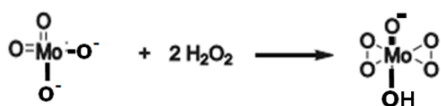
Lo anterior se apoya en los supuestos siguientes:

La relación molar de peróxido de hidrógeno a ión molibdato, en la formación del complejo peroxomolibdico es 2:1, según demostraran Chai y colaboradores.²²

El peróxido de hidrógeno oxida el ión molibdato en una relación molar 2:1, formándose un complejo peroxianiónico: el peroxomolibdico.



En la primera se obtiene un complejo con estructura octaédrica, como se refleja a continuación:



En el segundo caso la estructura del complejo molibdico adopta forma dodecaédrica, pero requiere un exceso de peróxido y en las condiciones del presente experimento ésta situación no se manifiesta.²³

Fue Korolyuk quien sugiriera en 1988 tal reacción.¹³ Esta reacción es muy rápida y está favorecida a temperatura ambiente. Presupone un equilibrio entre ambas especies del molibdeno, favoreciéndose el sentido de la reacción directa en presencia de medios ligeramente ácidos. Otra manera de desplazar el equilibrio es garantizando una elevada concentración de molibdato.²²

Se conoce que en la reacción del peróxido con el molibdato también se produce oxígeno molecular, pero en pequeñas cantidades, en dependencia de las condiciones de la reacción y al cabo de un tiempo considerable, tomando como referencia al de

lectura.²³ Además, se ha reportado una reacción entre el peróxido y el molibdato, suspendidos en una microemulsión tipo micela invertida (W/O) donde la descomposición del primero en presencia del segundo forma complejos oxotriperoxomolibdato $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$ que por descomposición liberan oxígeno al estado de singlete ($^1\text{O}_2$) con una eficiencia del 100%.²⁴ Éste complejo parece un intermedio que hubiere reaccionado con 3 moles de peróxido, entre los dos anteriores, el que lo hizo con dos (estructura octaédrica) y el que reaccionara con cuatro (estructura dodecaédrica).

Cuando se implementa un ensayo enzimático no es suficiente con probar la enzima purificada, sino es necesario corroborar si la matriz donde ésta se ensayará interfiere o no. El contenido intraeritrocitario es complejo, de ahí sea imprescindible analizar diferentes diluciones de la misma.

Como se aprecia en la figura 7 a medida que disminuye la dilución de hemolisado hay más peróxido consumido y por ende menos remanente, lo cual es indicativo que hay más actividad enzimática, que equivale a decir mayor cantidad de enzima activa.

Para corroborar la veracidad del método se impone realizar ensayos de precisión y exactitud.²⁵

A continuación se muestra la precisión intra e inter-corrida (Tabla 2) donde es de destacar los adecuados valores de los coeficientes de variación. Válido resaltar que para el caso de las enzimas son aceptables valores hasta del 10 % de variación.

Hussein⁴ obtuvo coeficientes de variación menores para ambas condiciones pero debemos destacar que empleó suero sanguíneo en lugar de hemolisados, un método diferente y otras variables diferentes. Por otra parte Hadwan²⁰ obtuvo valores de 3,4% y 5,9% comparables a los nuestros, con la diferencia que emplearon un sistema analítico diferente, basado en la formación de un complejo de ácido percrómico.

La tabla 3 muestra los valores de comparación dos a dos entre el método analizado y los métodos Aebi y el de titulación con tiosulfato.

En ambos se obtienen buenos valores de correspondencia entre unos y otros métodos lo cual denota la veracidad de la propuesta realizada.

Un referente de mucha utilidad para la conservación de las muestras de hemolisados es el análisis de la crioestabilidad de la enzima en las muestras. En el presente estudio, para la temperatura de -8 °C no hubo variaciones apreciables entre los valores de AE catalásica durante 51 días respecto al valor inicial, y a -70 °C se

mantuvieron estables durante los 2 meses. Esto brinda la posibilidad de postergar la realización de los ensayos y hasta el ahorro de reactivos, temática vital para cualquier laboratorio.

Conclusiones

La determinación de catalasa en contenido intrahemático, por formación de complejos peroxomolibdicos, cumple con los parámetros establecidos para la calidad analítica. Esto deriva del empleo de diluciones de hemolisados en un rango que minimiza las interferencias debidas a la hemoglobina y a la generación de turbidez. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno, como sustrato saturante, garantizan la óptima formación de los complejos en una relación muy cercana a la estequiométrica 2:1 respecto al molibdato. Además, la restricción del tiempo de reacción a un minuto no solo protege la enzima de daños oxidativos por la exposición al peróxido, sino también favorece la formación de los complejos y disminuye la emanación de burbujas de oxígeno molecular, que es otra interferencia apreciable que debe ser controlada. Se corrobora una cinética de reacción de primer orden y los parámetros de precisión y exactitud son adecuados para un ensayo enzimático.

Bibliografía

1. Olson K, Gao Y, De Leon E, Arif M, Arif F, Arora N, et al. Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: an ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species. *Redox Biol* 2017;12:325–39.
2. Jayachitra A, Padma P. Antioxidant potential of *Clitoria Ternatea* of leaf extracts in vitro. *Int J Pharm Bio Sci* 2012; 3(4): 753 – 763.
3. Sarkar S, Mukherjee S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S. Differential modulation of cellular antioxidant status in zebrafish liver and kidney exposed to low dose arsenic trioxide. *Ecotoxicol Environ Saf* 2017;135:173–82.
4. Hussein M. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochemistry* 2018; 19:7.
5. Apel K, Hirt H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 373-399.
6. Pereyra M, Quiriban A. Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *Semiárida* 2014; 24(1):55-67.
7. Díaz A. La estructura de las catalasas. *REB* 2003; 22 (2): 76-84.

8. Aebi H. Catalase in vitro. En: Methods Enzymol. Vol. 105, Packer L (Editor), pp 121-6. Academic Press, New York;1984.
9. Dille R, Watkins C. A method for the determination of plasma catalase and the values obtained in normal adults. J Lab Clin Med 1948; 33, 480.
10. Feinstein R. Perborate as substrate in a new assay of catalase. J Biol Chem 1949; 180, 1197.
11. Sinha A. Colorimetric assay of catalase. Anal biochem 1972; 47, 389-394.
12. Goth L. Simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991; 196, 143-152.
13. Korolyuk M, Ivanova L, Maiorova I, Tokarev V. A method for measuring catalase activity. Lab Delo 1988; 16-19.
14. Sumner J. The Chemical Nature of Catalase. En Nord F, Werkman C (Eds.): Advances in Enzymology, New York, Interscience; 1946, Vol. 1, p. 166.
15. Maehly A. The Assay of Catalases and Peroxidases. En Glick D (Ed.): Methods of Biochemical Analysis, New York, Interscience; 1954, Vol. 1, p. 378.
16. Gold S, Proctor B. Photometric determination of catalase activity. J Biol Chem 1950;187, 705.
17. Shivakumar A, Nagarajab P, Chamaraja N, Krishna H, Avinash K. Determination of catalase activity using chromogenic probe involving iso- nicotinicacidhydrazide and pyrocatechol, Journal of Biotechnology 2011;155, 406– 411.
18. Nashar R. Flow injection catalase activity measurement based on gold nanoparticles/ carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. Talanta 2012; 96,161–167.
19. Hadwan M. New method for assessment of serum catalase activity. Indian J Sci Technol 2016;9:1–5.
20. Hadwan M, Abed H. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. Data in brief 2016;6:194–9.
21. Methods in Enzymology. Tomo II. Colowick S, Kaplan N (Eds). Academic Press Inc. Nueva York; 1955, Sección V: Enzimas respiratorias, p.780.
22. Chai X, Hou Q, Luo Q, Zhu J. Rapid determination of hydrogen peroxide in the Wood pulp bleaching streams by a dual-wavelength spectroscopic method. Anal Chim Acta 2004;507:281-84. Disponible en: <http://www.paper.edu.cn>. Revisado: junio 8 de 2019.
23. Kenten R, Mann G. The Action of Peroxidase Systems on Ferrocyanide, Molybdate, Tungstate and Vanadate. Biochem 1951; 50.

24. Díaz C, León F, Daza M, Martínez F. Oxidación de linoleato de metilo con oxígeno singulete generado químicamente por el sistema molibdato de sodio/peróxido de hidrógeno. Rev Fac Ing Univ Antioquia 2009;48:38-44.

25. United States. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation. 2018. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

Anexos

Tabla 1. Procedimiento analítico para la cuantificación del peróxido remanente de la reacción enzimática, por formación de complejos peroxomolibdicos:

	Muestra (M)	Blanco muestra (BM)	Peróxido total (PT)	Blanco peróxido total (BP)
Muestra de hemolisado	50 uL	50 uL		
Agua destilada			50 uL	50 uL
buffer	-	2000 uL		2000 uL
Peróxido tamponado	2000 uL		2000 uL	
Esperar un minuto a 25 °C				
Molibdato de amonio 32,4 mM	1000 uL	1000 uL	1000 uL	1000 uL
Vórtex moderado hasta desaparición de burbujas de oxígeno. Esperar 5 minutos				
Leer a 400 nm				

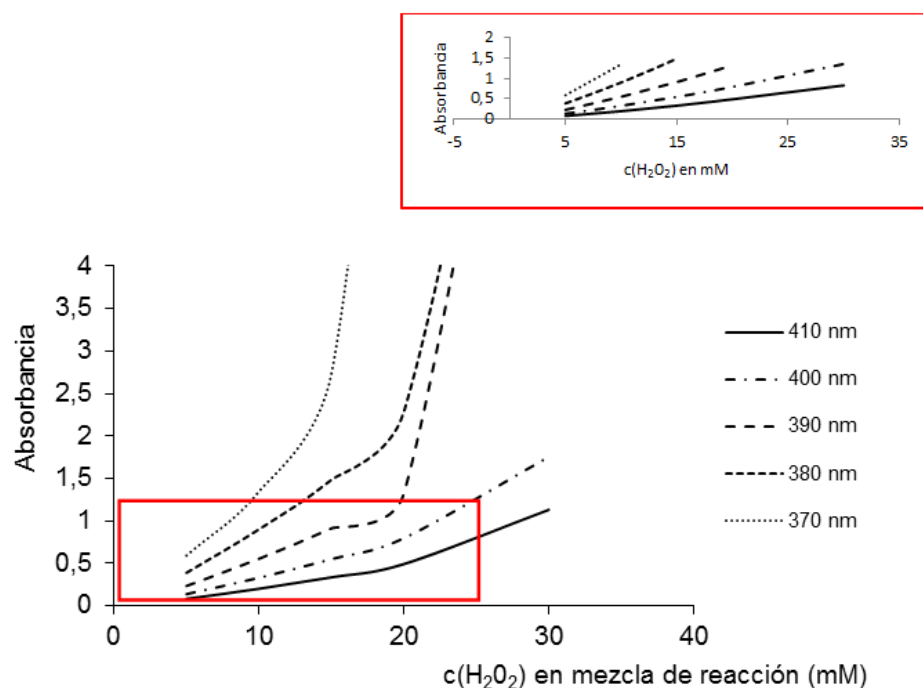


Figura 1. Variación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda, en función de la concentración de peróxido en mezcla de reacción. Encerrado en un recuadro rojo (y aumentado de escala) las rectas de mejor ajustes entre ciertos rangos de concentraciones de peróxido y de absorbancia.

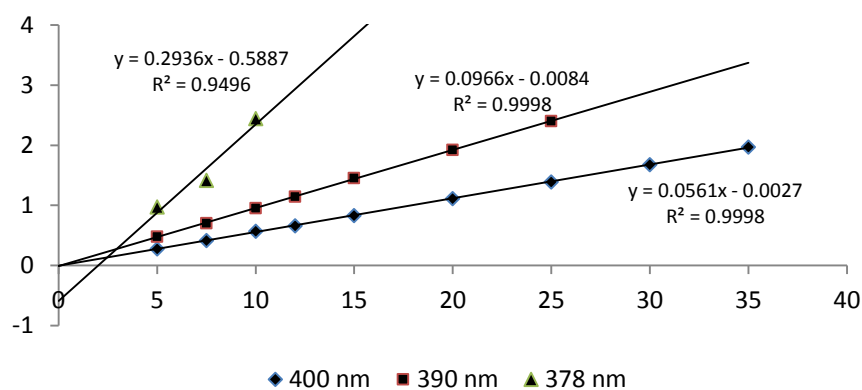


Figura 2. Variaciones en la absorbancia de los complejos peroxomolibdicos formados a concentraciones de peróxido de hidrógeno añadido entre 5-35 mM, a diferentes longitudes de onda.

Absorbancia 400 nm

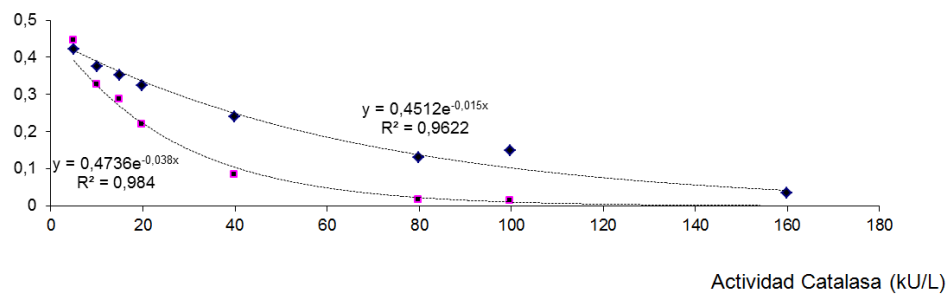
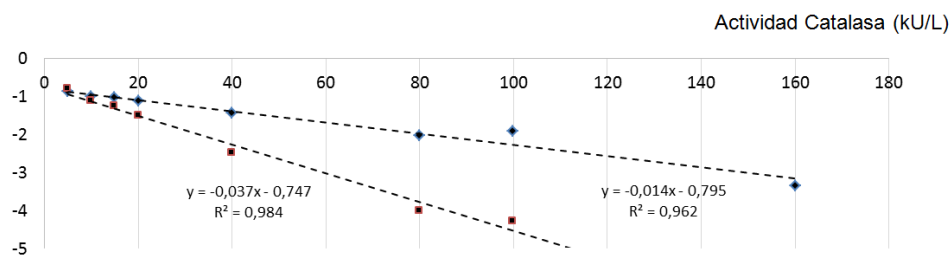


Figura 3. Relación entre la intensidad de la formación de complejos peroxomolíbdicos en función de la actividad de la enzima pura a 1 y 2 minutos de reacción.



Log Abs_{400 nm}

Figura 4. Ajuste de la figura 3 a una escala semilogarítmica.

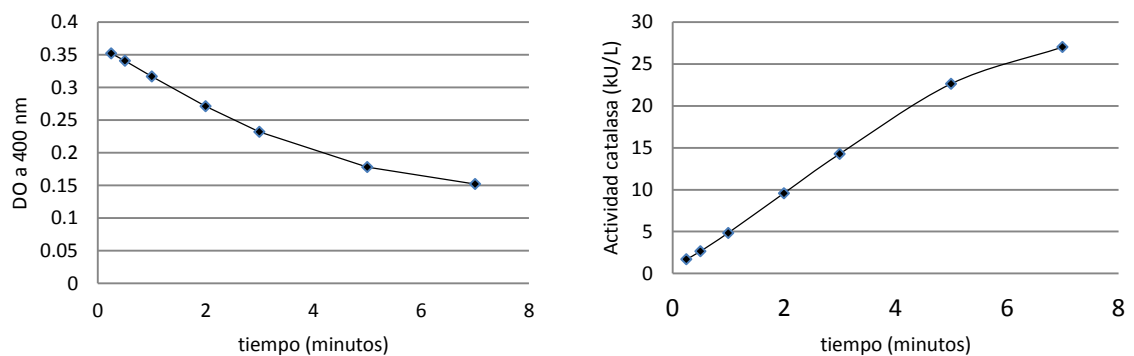
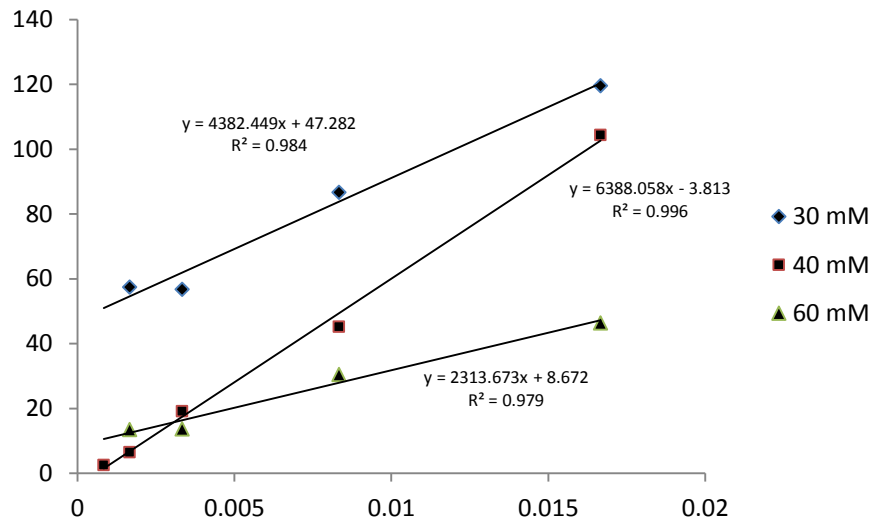


Figura 5. Variaciones de la absorbancia (a la izquierda) y la actividad enzimática (a la derecha) respecto al tiempo de incubación.

Actividad Catalasa (kU/L)



Dilución de la enzima

Figura 6. Actividad catalasa a diferentes diluciones de la enzima en el pool de hemolisado variando las concentraciones de peróxido. (Dilución = 1/Factor de dilución)

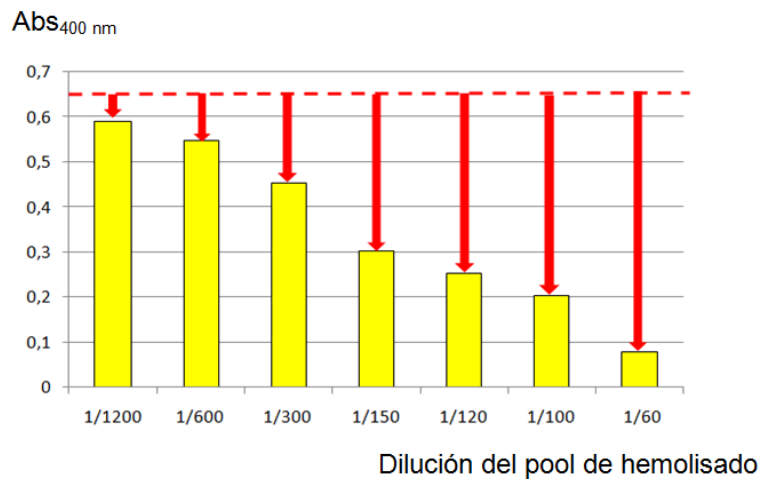


Figura 7. Variaciones de la absorbancia de los complejos peroxomolíbdicos formados (barras amarillas) pasado 1 minuto de reacción, de los hemolisados a diferentes diluciones. La línea roja discontinua representa la intensidad de color máxima en ausencia de hemolisado y las flechas en igual color indican la absorbancia resultante del consumo de peróxido para cada dilución de hemolisado.

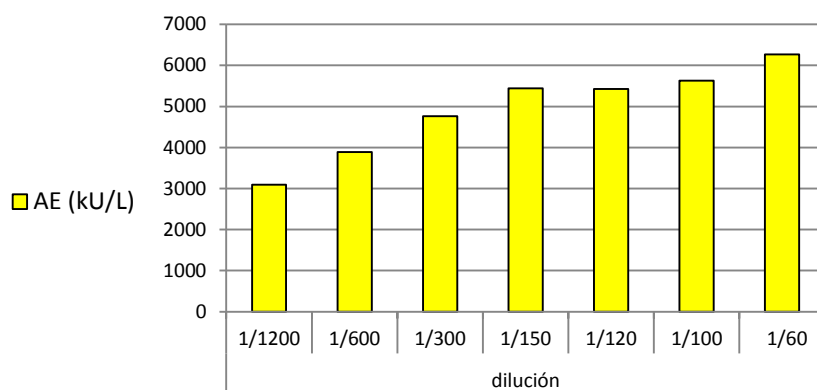


Figura 8. Variaciones de la actividad catalasa con la dilución del pool de hemolisado.

Tabla 2. Precisión intra e inter-corrida. Catalasa en hemolisados por formación de complejos peroxomolibdicos.

Precisión	N	Media $\pm$ DE (kU/L)	CV (%)
Intra-corrida	20	5597 $\pm$ 208	3,72
Inter-corrida	20	5486 $\pm$ 290	5,29

Fuente: datos de la investigación.

Tabla 3. Comparación de métodos para estimar catalasa en hemolisados. Coeficientes de correlación. N=20

	Aebi	Titulación con tiosulfato
Complejos peroxomolibdicos	0,9869	0,9903

Fuente: datos de la investigación.