

# Las lectinas del *Myrtus communis* L., como agentes de enlace en la inmovilización de enzimas.

## I.—Ureasa

por

M. ORTEGA y P. ANDRES

Departamento de Técnicas Instrumentales. Facultades de Farmacia de Alcalá de Henares y Complutense. Madrid (Spain)

### SUMMARY

A support system to immobilize urease is presented using glutaraldehyde-fixed blood red cells which have been saturated by *Myrtus communis* seed lectins. The optimum pH for immobilization, pH and temperature at which maximum activity is achieved, stability after storage and after its action on different substrates and resistance to heat and inhibitors have been studied. The Michaelis-Menten constant for the immobilized urease has been determined and the results have been discussed comparing with soluble urease immobilized on other supports.

The proposed system is as efficient as other ones already known.

### INTRODUCCIÓN

Una enzima inmovilizada se define como aquella que, por un camino u otro, se encuentra constreñida dentro de los limitados confines de un soporte.

En un principio lo que se buscaba con la inmovilización de la enzima era la preparación de un sistema que, sin pérdida de su actividad, pudiese usarse de manera continuada por horas, o aún días, y que pudiera conservarse a temperatura ambiente por meses o años. De esta forma, técnicas analíticas que los altos costes de las enzimas las hacían prohibitivas, se han podido convertir en técnicas de rutina, y lo mismo puede decirse de la aplicación a escala industrial de los reactores enzimáticos.

En el momento actual, la aplicación de las enzimas inmovilizadas se amplía de manera continuada, especialmente en el campo biomédico.

Los sistemas de inmovilización son diferentes, aunque el resultado final nos lleve a uno de estos dos tipos: a) enzimas incorporados a la matriz del soporte y b) enzimas unidos superficialmente al soporte.

del soporte, mientras que el segundo será útil para todo tipo de sustratos, independientemente de su peso molecular.

Los soportes usados son de naturaleza diferente, pudiendo citarse entre ellos: a) polisacáridos del tipo DEAE-Sephadex (diethyl-amino-ethyl-sephadex), DEAE-celulosa, quitina; b) inorgánicos, como vidrio poroso, alúmina, hidroxil-apatito, silicato aluminico, etc.; c) proteínas fibrosas, como el colágeno o la queratina; d) resinas fenólicas, como Duolite ES-762; e) hidrogeles, como el almidón o la poli-acrilamida.

La mayoría de las enzimas inmovilizadas tienen modificadas sus características cinéticas en comparación con la misma enzima en solución. La actividad disminuye de manera general, pudiendo ser debido a cambios conformacionales como consecuencia de la inmovilización, o el encontrarse la enzima en un entorno diferente; también puede ser motivada por efectos de difusión, muy manifiestos en el caso de las enzimas inmovilizadas en el interior de la matriz soporte, ya que el sustrato debe difundir al interior del soporte para interaccionar en presencia de la enzima, difundiendo a continuación los productos de la reacción hacia la solución.

En este trabajo se describe un nuevo sistema para inmovilizar enzimas, mediante el empleo como agente intermediario del enlace enzima-soporte, de las lectinas de las semillas del *Myrtus communis* L., ya que se pudo comprobar que existía algún tipo de interacción entre la ureasa y el extracto de la semilla por la formación de un precipitado manifiesto.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El soporte para la ureasa lo constituía el sistema de hematies fijados con glutaraldehído al que se le une la lectina HGM, su preparación ya fue descrita en un trabajo anterior (1).

##### *Inmovilización de la ureasa*

De manera general, se utilizaban aproximadamente 100 mg. del sistema HGM liofilizados, que se ponían en contacto con 10 ml. de una solución de ureasa (Merk) en buffer de Mc Ilvaine de pH 6, conteniendo 10 mg. de la misma; se mantenían en agitación durante 30 minutos, centrifugando y eliminando el sobrenadante. Los hematies se lavan a continuación con el mismo buffer, hasta que los líquidos de lavado no muestren absorbancia a 280 nm. Ello constituye el sistema de enzima inmovilizado, que denominamos HGMU, que puede ser liofilizado para su conservación.

\* \* \*

Para la determinación de la actividad de la enzima se ha seguido la técnica de Fawcett y Scott (2) fundada en la formación de carbonato amónico a partir de la urea, y valoración posterior de aquel por la obtención de un complejo coloreado con los reactivos de fenol e hipoclorito (Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica).

La solución sustrato de urea (Merk) era 0,5 mM en buffer de Mc Ilvaine de pH 6,7. La utilización de este pH en las determinaciones es para situarnos dentro del margen recomendado 6,5-6,9, ya que fuera de él se produce carbamato amónico que, lentamente, pasa a carbonato.

La solución de trabajo de la ureasa era de 1 mg por ml en el mismo buffer de Mc Ilvaine. Su preparación para ensayos comparativos era siempre extemporánea.

La metodología seguida para las determinaciones de la actividad de la enzima inmovilizada fue la siguiente: 20 mg del sistema HGMU se ponían en contacto con 0,1 ml de la solución buffer y se añadía 0,2 ml de la solución sustrato de urea, incubando durante 10 minutos, con agitación intermitente, pasados los cuales se enfriaba el sistema para paralizar la reacción, centrifugando a continuación durante 15 minutos, tomando 0,15 ml del sobrenadante para hacerlos reaccionar con los reactivos de fenol-nitroprusiato e hipoclorito sódico, que tras la incubación a 37° C por diez minutos, permite hacer la lectura espectrofotométrica a 550 nm frente a un blanco de reactivos.

##### *Resultados obtenidos*

Para conocer las propiedades de la enzima ureasa inmovilizada se han efectuado las pruebas siguientes:

- a) Influencia del pH en la inmovilización.
- b) Influencia del pH en la actividad de la enzima.
- c) Influencia de la temperatura en la actividad.
- d) Estabilidad del sistema HGMU a la conservación.
- e) Estabilidad del sistema HGMU a la acción sucesiva de sustratos diferentes.
- f) Estabilidad del sistema HGMU a la acción de soluciones de diferentes pH y a temperaturas igualmente diferentes.
- g) Efectos de inhibidores.
- h) Determinación de la constante de Michaelis.

##### *Influencia del pH en la inmovilización*

De acuerdo con la metodología general, se ponía en contacto el sistema HGM con soluciones de ureasa a pH 6, 7 y 8; valores inferiores

a 6 no podían utilizarse por la insolubilidad de la enzima de punto isoeléctrico 5.

Para seguir el proceso de inmovilización se determinaba la variación de la actividad de los sobrenadantes.

Los resultados se expresan en valores relativos, tomando como 100 por 100 de actividad la que corresponde a la solución inicial de ureasa que se pone en contacto con los hematíes HGM.

La tabla I nos muestra los valores de tres ensayos diferentes.

TABLA I

*Influencia del pH en la inmovilización*

| pH | % de actividad de los sobrenadantes |     |     | Sobrenadantes<br>valor medio % | Inmovilizado<br>valor medio % |
|----|-------------------------------------|-----|-----|--------------------------------|-------------------------------|
|    | 1.º                                 | 2.º | 3.º |                                |                               |
| 6  | 30                                  | 42  | 50  | 40.6                           | 59.5                          |
| 7  | 65                                  | 68  | 67  | 66.7                           | 33.3                          |
| 8  | 82                                  | 80  | 85  | 82.3                           | 17.7                          |

Parece evidente que puede sacarse ventaja de la utilización de soluciones de pH 6 para lograr mayores rendimientos en el proceso de inmovilización, de aquí que se adoptaran estas condiciones de trabajo en la metódica general.

Un dato muy interesante de conocer es el factor de efectividad del sistema HGMU, que se define, como sabemos por el cociente de las actividades de la enzima inmovilizada y en solución, dato éste que nos podría dar gran información sobre la pérdida de actividad de la enzima por la inmovilización. Su determinación, sin embargo, resulta difícil en nuestro caso, ya que no podremos conocer con exactitud, por la propia técnica de preparación del sistema HGMU (con lavados sucesivos, liofilización, etc.) la cantidad de ureasa unida por miligramo de HGM.

Un dato aproximado, si podemos aventurar, y según el cual, la disminución de la actividad de la ureasa en virtud de su inmovilización supera el 50 por 100.

*Influencia del pH en la actividad de la enzima*

Para poder conocer este dato se prepararon soluciones de la ureasa en buffer de Mc Ilvaine de pH 5, 6, 7, 8 y 9 a concentración de 1 mg por ml, y suspensiones de 20 mg del sistema HGMU en los mismos

buffers, e igualmente los sustratos de urea 0,5 mM, siendo la temperatura de incubación en todos los casos de 37° C.

La tabla II nos representa los resultados obtenidos y como ya indicamos en la experiencia anterior, se le da el valor 100 por 100 de actividad a aquella en que ésta es máxima.

TABLA II

*Influencia del pH en la actividad de la enzima*

| pH  | % actividad ureasa en solución |      |      |             |
|-----|--------------------------------|------|------|-------------|
|     | 1.º                            | 2.º  | 3.º  | Valor medio |
| 5   | 0                              | 0    | 5    | 1.7         |
| 6   | 22.8                           | 17.6 | 16.7 | 19          |
| 6.7 | 74.3                           | 70.6 | 72.2 | 72.4        |
| 7   | 82.8                           | 88.2 | 86.1 | 85.7        |
| 8   | 97.1                           | 100  | 100  | 99          |
| 9   | 100                            | 100  | 100  | 100         |

  

| pH  | % actividad sistema HGMU |      |      |             |
|-----|--------------------------|------|------|-------------|
|     | 1.º                      | 2.º  | 3.º  | Valor medio |
| 5   | 20                       | 21.1 | 21.4 | 20.8        |
| 6   | 36.7                     | 33.2 | 35.7 | 35.2        |
| 6.7 | 86.7                     | 95   | 89.3 | 90.5        |
| 7   | 100                      | 100  | 100  | 100         |
| 8   | 93.3                     | 95.1 | 92.9 | 93.8        |
| 9   | 80                       | 88   | 85.7 | 84.6        |

La comparación entre los dos sistemas muestra el salto a pH más bajos del máximo de actividad de la ureasa inmovilizada y la actividad de ésta, aunque baja, a pH 5, cuando en el sistema soluble es prácticamente nula al coincidir con el punto isoeléctrico de la enzima.

*Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima*

En este caso las soluciones de ureasa (1 mg/ml) se prepararon lo mismo que la suspensión del sistema HGMU, en buffer de pH 6,7, siendo las temperaturas de incubación de 30, 40, 50, 60 y 70° C, respectivamente.

La tabla III, muestra los valores medios de tres ensayos para ambos tipos de sistemas.

TABLA III

*Influencia de la temperatura en la actividad*

| Temperatura incubación | % actividad ureasa en solución | % actividad HGMU |
|------------------------|--------------------------------|------------------|
| 30°                    | 48                             | 71.3             |
| 40°                    | 79.8                           | 70.6             |
| 50°                    | 95.8                           | 76.8             |
| 60°                    | 100                            | 85.3             |
| 70°                    | 93.7                           | 100              |

*Estabilidad del sistema HGMU durante la conservación*

Es este un dato de gran interés, a la vista de las posibles aplicaciones del sistema.

Para la experiencia, el sistema HGMU se conservaba en un caso liofilizado, y en otro en suspensión en buffer de pH 6.7, y para dos condiciones de temperatura, en nevera (4° C) o temperatura ambiente (17-25° C).

Para representar la actividad, se le ha dado el valor 100 por 100 a la que corresponde al primer día de la preparación del sistema, y con relación a ella se expresan las de los días sucesivos.

La tabla IV representa los valores medios de los ensayos consecutivos.

TABLA IV

| Tiempo conservación en días | % actividad HGMU liofilizados |        | % actividad HGMU suspensión pH 6.7 |        |
|-----------------------------|-------------------------------|--------|------------------------------------|--------|
|                             | Temperatura ambiente          | Nevera | Temperatura ambiente               | Nevera |
| 1                           | 100                           | 100    | 100                                | 100    |
| 2                           | 92.9                          | 81.3   | 83.0                               | 79.2   |
| 3                           | 83.9                          | 81.3   | 78.7                               | 77.1   |
| 7                           | 75.0                          | 65.3   | 74.5                               | 64.2   |
| 21                          | 62.5                          | 61.5   | 54.3                               | 58.3   |
| 30                          | 55.4                          | 60.4   | 46.8                               | 56.3   |

*Estabilidad del sistema HGMU a la acción de sucesivos sustratos diferentes*

Se intentó el ensayo mediante el empleo de una pequeña columna con el sistema HGMU, reciclando el sustrato de urea a su través, pero encontramos dificultades de flujo dada la propia naturaleza del sistema. Se siguió entonces la técnica general, con 20 mg de HGMU y la solución de trabajo de urea de pH 6,7 (0,2 ml + 0,1 ml buffer); tras la incubación, se enfriaba el conjunto y se recogía el sobrenadante de la centrifugación, en el que se determinaba la urea descompuesta deduciendo de ella la actividad de la enzima. El sistema HGMU centrifugado se lavaba con 2 ml de buffer y se le añadía un nuevo volumen del sustrato de urea, repitiéndose el proceso hasta siete veces.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V y representan valores medios de ensayos repetidos.

TABLA V

*Estabilidad del sistema HGMU a sustratos sucesivos*

| Número de pasos | % actividad residual |
|-----------------|----------------------|
| 1               | 100                  |
| 2               | 80.4                 |
| 3               | 75                   |
| 4               | 75                   |
| 5               | 68                   |
| 6               | 69                   |
| 7               | 70                   |

*Estabilidad del sistema HGMU a la acción de soluciones de distintos pH y a temperaturas diferentes*

Con el fin de conocer la estabilidad del sistema en condiciones más o menos adversas, se prepararon una serie de muestras con 20 mg de HGMU, a los que se añadieron 5 ml de soluciones buffer de Mc Ilvaine de pH 5, 6, 7 y 8, manteniéndolos durante tres horas a temperatura ambiente y con agitación.

Pasado dicho tiempo se centrifugaba, eliminando el sobrenadante, añadiendo a continuación el sustrato de urea y determinando la actividad residual del sistema, relacionándola con la del mismo sistema no sometido a este tratamiento y al que se le daba el valor 100 por 100.

Para conocer el efecto de la temperatura sobre el sistema se prepararon muestras de 20 mg de HGMU, a las que se añadían 3 ml de buffer de Mc Ilvaine de pH 6.7, manteniéndolas durante 60 minutos, con agitación, a temperaturas de 30, 40, 50, 60 y 70° C. Se centrifugaban a continuación, se separaba el sobrenadante, del que se hacía su espectro de absorción entre 240 y 400 nm, y al sedimento de HGMU se le añadía el sustrato de urea de trabajo, para determinar la actividad residual de cada una de las muestras.

A efectos comparativos, la solución de ureasa de 1 mg por ml a pH 6.7, se sometía a las mismas condiciones de temperatura, determinando a continuación su actividad enzimática.

La tabla VI nos muestra los resultados obtenidos representando valores medios de dos ensayos, en el caso de los pH y de tres ensayos para las temperaturas.

TABLA VI

*Estabilidad del sistema HGMU a la acción de temperaturas y pH diferentes*

| Temperatura | % de actividad residual |              |
|-------------|-------------------------|--------------|
|             | HGMU                    | Urea soluble |
| 30°         | 82.7                    | 69.9         |
| 40°         | 81.7                    | 60.5         |
| 50°         | 82.6                    | 61.8         |
| 60°         | 83.5                    | 58           |
| 70°         | 42.8                    | 54           |
| pH          |                         |              |
| 5           | 70                      |              |
| 6           | 70                      |              |
| 7           | 74                      |              |
| 8           | 73.6                    |              |

Como quiera que los espectros de los sobrenadantes de los ensayos anteriores con HGMU hacían sospechar la redisolución de ciertas porciones de la enzima inmovilizada, se determinó con ellos la actividad ureásica, previa liofilización de los mismos. En todos se detectó actividad enzimática de valor superior a la que cabía esperar, a la vista de la actividad residual de las respectivas muestras de HGMU, sobre todo en los ensayos de temperaturas 50°, 60° y 70° C. Este fenómeno podría explicarse por el simple hecho de que la enzima disuelta recupera la actividad perdida por la inmovilización.

#### *Determinación de la constante de Michaelis*

Se ha seguido el método gráfico de Lineweaver-Burk, representando los valores inversos de  $V_0$  y de la concentración de sustrato en ordenadas y abscisas respectivamente.

Las concentraciones del sustrato para los respectivos ensayos fueron:

$$2,5 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-3}, 1,5 \times 10^{-3}, 2,5 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

Los valores obtenidos para las condiciones de trabajo de pH 6.7, y temperatura de incubación de 37° C fueron:

$$\text{ureasa soluble } K_m = 5,3 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{sistema HGMU } K_m = 2,11 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

#### *Efecto de inhibidores*

Para conocer el comportamiento del sistema HGMU frente a inhibidores se realizaron una serie de ensayos, empleando ion cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) como inhibidor.

Se prepararon soluciones sustrato de urea de pH 6,7 que contenían concentraciones de sulfato de cobre de 1, 0,5, 0,1 y 0,05 mg/ml. en las que se determinaba la actividad del sistema HGMU.

De manera similar se procedía con la ureasa soluble, disolviendo en las soluciones de sulfato de cobre antes citada, ureasa a la concentración de trabajo de 1 mg/ml.

La tabla VII nos muestra los porcentajes de actividad con referencia a las actividades iniciales en ausencia de inhibidor, y corresponden al valor medio de dos ensayos sucesivos.

TABLA VII

| SO <sub>4</sub> Cu en mg/ml | % actividad de la ureasa |      |
|-----------------------------|--------------------------|------|
|                             | soluble                  | HGMU |
| 0                           | 100                      | 100  |
| 0.05                        | 100                      | 100  |
| 0.10                        | 78.2                     | 84.1 |
| 0.50                        | 60.9                     | 55.6 |
| 1.00                        | 50                       | 38.8 |

### Discusión de los resultados

Está comprobada la efectividad del sistema de hematies fijados por glutaraldehído y saturados con los componentes del extracto de semillas de *Myrtus communis* (HGM) para inmovilizar a la ureasa, fenómeno éste que resulta ser dependiente del pH, con un máximo de efectividad al valor de 6.

Es sabido que de manera general, la inmovilización de una enzima lleva consigo una pérdida de su actividad, cosa que también está ocurriendo en nuestro sistema HGMU. Ya hemos comentado las dificultades que se presentan para conocer con exactitud la ureasa que queda unida por mg de soporte, debido a que en la preparación del sistema final de trabajo, se verifican no menos de seis lavados con solución buffer y un proceso final de liofilización.

Las medidas realizadas nos muestran que la pérdida de actividad en los lavados es del orden del 50 por 100, gran parte de ella debido a la solubilización de ureasa débilmente unida al soporte. En la liofilización, sin embargo, no se ha apreciado variación aparente en la actividad.

Esta pérdida de actividad no creemos invalida el proceso, ya que tan fuerte, o superiores, son las pérdidas que sufren otras enzimas en soportes semejantes como, por ejemplo, la uricasa inmovilizada en albúmina por intermedio de glutaraldehído, que pierde en el proceso un 60 por 100 de su actividad (3), o la  $\beta$ -glucuronidasa incorporada a hematies por la técnica del intercambio hipotónico, que sólo lo hace en una cuantía del 4,4 por 100 del original (4).

El estudio del pH óptimo para la ureasa inmovilizada nos ha proporcionado dos datos de interés; el primero, que la actividad máxima se desplazará respecto a la ureasa soluble del pH 8-9, al pH 7,

lo cual no deja de ser una gran ventaja con vistas a una posible utilización «in vivo» del sistema de estudio, y el segundo que a pH 5, presenta una actividad apreciable en contraste con la ureasa soluble al coincidir con su punto isoeléctrico.

Este cambio del máximo de actividad a pH inferiores, se interpreta por una modificación del microentorno de los grupos activos de la ureasa, como consecuencia a su fijación sobre el soporte HGM. En este caso cabe suponer que los centros activos de la ureasa en HGMU, están detectando un microentorno más básico que el que corresponde a la solución buffer en la que se encuentra.

En la temperatura de incubación también se encuentran diferencias entre la ureasa soluble y el sistema HGMU, favorables igualmente a este último.

En la ureasa soluble, la temperatura óptima para un máximo de actividad se sitúa en los 60° C, con una disminución patente al descender la temperatura, llegando a ser del 52 por 100 inferior a los 30° C. Para el sistema HGMU el máximo de la actividad se obtiene a 70° C, aunque este resultado deberá ser sometido a revisión pues al simple fenómeno de incubación se le puede estar añadiendo un proceso de liberación de la enzima con un aumento de la actividad una vez disuelta, fenómeno éste que se ha podido comprobar en los ensayos de resistencia a los agentes exteriores, temperaturas y pH. Allí hemos visto que después de una hora a 70° la actividad del sistema se había reducido al 42,8 por 100 de la original, motivada en parte por la solubilización de la enzima. Aquí la incubación es solo de diez minutos, pero puede ser suficiente para que la pequeña dosis liberada de ureasa, haga aparecer la temperatura de 70°, como la óptima para la mayor actividad de la enzima inmovilizada.

De cualquier forma, un hecho sí parece evidente, y es que hay una mayor uniformidad en las actividades para el intervalo de temperaturas estudiadas hasta el punto de que la diferencia en actividad entre los 60° y 30°, que en la ureasa soluble ya hemos visto, era del 52 por 100, aquí solo es del 14 por 100. Esto también representa una ventaja con vistas a su posible empleo «in vivo».

La estabilidad del sistema a la conservación se puede considerar dentro de lo que parece ser normal para otros sistemas, ya que pasados 30 días mantiene una actividad equivalente al 55 por 100 de la inicial, si la conservación es a temperatura ambiente y liofilizado, o del 60 por 100 si es en nevera a 4°. Cuando la conservación es con el sistema de suspensión en buffer de pH 6.7, las actividades residuales son del 46,8 por 100 a temperatura ambiente y del 56,3 por 100 en nevera.

Muy positivo puede considerarse también, el dato de la estabilidad de la ureasa inmovilizada tras pasos sucesivos sobre sustratos diferentes que, en nuestro caso, fueron siete, y si tenemos en cuenta las

dificultades técnicas para reutilizar, sin pérdida aparente, el sistema HGMU dichas siete veces, el detectar un 70 por 100 de la actividad inicial es demostrativo de su alta estabilidad.

La resistencia a la temperatura del sistema HGMU es también manifiesta, permaneciendo prácticamente constante la actividad cuando se dispone durante setenta minutos a temperaturas entre 30° y 60° C. A 70° C, sin embargo, pierde casi el 57 por 100 de la actividad inicial, posiblemente por la acción conjunta de una solubilización parcial y los conocidos cambios conformacionales de las enzimas que afectan a la actividad.

Como ya se hecho mención anteriormente, la solubilización parcial puede seguirse por los espectros de absorción de los sobrenadantes, además de por la actividad enzimática de los mismos.

Cabe pues pensar que en este caso, si a los 70° se hubiese producido algún cambio conformacional, la enzima tiene capacidad de recuperación al descender la temperatura.

El valor de la constante de Michaelis-Menten se aparta, en nuestro sistema, del comportamiento general, al aparecer algo inferior que el encontrado para la ureasa soluble, aproximadamente la mitad,  $5,23 \times 10^{-3}$  M para la ureasa en solución y  $2,67 \times 10^{-3}$  M para HGMU, ambas a las condiciones de trabajo, pH 6,7, y temperatura de 37° C. May y Li (5) trabajando también con ureasa, pero inmovilizada sobre un sistema de membrana líquida a base de tensoactivos, a pH 6,7 y 25° C, obtiene unos valores de  $3,4 \times 10^{-3}$  M para la soluble y 0,18 M para la inmovilizada, es decir, siempre mayor para la inmovilizada que para la soluble. Estas diferencias mayores o menores, se interpretan como efectos de una difusión restringida del sustrato hacia la enzima inmovilizada, por cuyo motivo, la concentración actual del sustrato que la enzima es capaz de percibir, es menor que la concentración estequiométrica real del sustrato.

Si se acepta esta explicación, tendremos que concluir que para el sistema HGMU, no debe existir ninguna restricción del sustrato para ponerse en contacto con la enzima y, en todo caso, lo que sí podría estar ocurriendo es el fenómeno contrario, el de un mayor aporte de sustrato a la vecindad de la enzima inmovilizada.

Efectivamente, parece existir la evidencia de que el sustrato no se encuentra con ninguna barrera difusional que vencer, ya que al haberse enlazado con el soporte HGM a través de las lectinas del extracto de mirto, su localización es superficial, y precisamente en la superficie externa del hematíe fijado con glutaraldehído.

En la parte experimental no se han reseñado los resultados obtenidos cuando se siguen microscópicamente los procesos de inmovilización, mediante tinciones con Giensa, Wright, Gram, Sudan, etc., en los cuales se apunta la evidencia de un enlace superficial como antes se señalaba.

El comportamiento del sistema HGMU frente al inhibidor metálico,  $\text{Cu}^{2+}$ , es también coherente con lo anteriormente expuesto, ya que concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{2+}$ , hacen disminuir más fuertemente la actividad de la ureasa inmovilizada que la de la soluble; también aquí parece que nos encontramos ante un proceso que facilita un mayor aporte del inhibidor a las inmediaciones de la enzima.

En definitiva, creemos que el sistema propuesto para inmovilizar enzimas por intermedio de las lectinas, concretamente las del *Myrtus communis*, puede competir con éxito con los otros sistemas conocidos, especialmente en su doble vertiente, analítica y biomédica.

En este último caso, las experiencias previas realizadas con ratas Wistar, son muy alentadoras, ya que tanto el sistema HGM como el HGMU, son perfectamente tolerados cuando se administran por vía endovenosa. Nuevas experiencias están en progreso y serán publicadas con posterioridad.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) ORTEGA, M. y RÓDENAS, S.: «Clin. Chim. Acta», 92, 135-39, 1979.
- (2) FAWCETT, J. K. y SCOTT, J. E.: «Clin. Path.», 13, 156, 1960.
- (3) PORNANSKY, M. J.: *Biochemical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*. Ed. T. M. S. Chang Plenum Press, New York, tomo II, 1977, pág. 345.
- (4) THORPE, S. R., FIDDLER, M. B. y DESNICK, R. J.: *Enzyme therapy V: in vivo fate of  $\beta$ -glucuronidase in  $\beta$ -glucuronidase deficient mice*. «Pediat. Reg.», 9, 918, 1975.
- (5) MAY, S. W., LI, N. N.: «Biochem Biophys. Res. Commun.», 47, 1179-85, 1972.