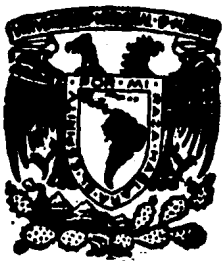


2ej. 14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

E.N.E.P. - ZARAGOZA

**OBTENCION DE UN PATRON DE HEMOGLOBINA DE
CONCENTRACION CONOCIDA.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GRISELDA VICTORIA JORDAN NUÑEZ**



MEXICO, D. F.

1986.



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 está 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.

CAPITULO 1	INTRODUCCION	pag. 1
1.1.	GENERALIDADES	pag. 1
1.2.	ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA	pag. 2
1.3.	LA HEMOGLOBINA EN LA QUÍMICA DE LA RESPIRACION	pag. 5
1.4.	BIOSINTESIS Y METABOLISMO	pag. 10
1.5.	CARACTERISTICAD Y VALORES CLINICOS	pag. 14
1.6.	TIPOS DE HEMOGLOBINAS	pag. 16
1.7.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA	pag. 17
CAPITULO 2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	pag. 21
CAPITULO 3	OBJETIVOS	pag. 22
CAPITULO 4	HIPOTESIS	pag. 23
CAPITULO 5	MATERIAL Y METODOS	pag. 24
5.1.	EQUIPO.....	pag. 24
5.2.	REACTIVOS	pag. 24
5.3.	METODOS	pag. 26
5.3.1.	PREPARACION DEL GEL Y EMPAQUETAMIENTO DE LA COLUMNA	pag. 26
5.3.2.	CALIBRACION DE LA COLUMNA	pag. 26
5.3.3.	PREPARACION DE LA MUESTRA	pag. 27
5.3.4.	OBTENCION DE LA HEMOGLOBINA	pag. 28
5.3.5.	CRITERIOS DE PUREZA	pag. 29
		33
5.3.6.	AJUSTE DEL PATRON DE HEMOGLOBINA	pag. 34
5.3.7.	ACONDICIONAMIENTO Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERA- DA.....	pag. 35
CAPITULO 6	RESULTADOS	pag. 37
CAPITULO 7	DISCUSION DE RESULTADOS	pag. 47
CAPITULO 8	CONCLUSIONES	pag. 48
CAPITULO 9	BIBLIOGRAFIA	pag. 49.
CAPITULO 10	APENDICE	pag. 52

1. INTRODUCCION.

1.1 GENERALIDADES.

Dentro de la estructura y fisiología celulares, algunas proteínas son los -- compuestos de mayor importancia debido a que forman la masa principal de todos los tejidos; entre las funciones de las proteínas encontramos las siguientes: - reproducción de las células; con el correspondiente traspaso de material genético del cuál se encargan las nucleoproteínas, la actividad enzimática de las - células está a cargo de proteínas que ejercen acción catalítica y determinan la velocidad de reacción y sentido del metabolismo, el transporte de oxígeno de -- los mamíferos, se lleva a cabo por la proteína llamada hemoglobina, la cuál tiene la capacidad de fijar el oxígeno molecular; ciertas hormonas especialmente - las hipofisarias son también derivados de aminoácidos; los anticuerpos que son responsables de las reacciones y mecanismos de defensa a las infecciones son -- proteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas; otras proteínas son responsa-- bles del acortamiento ó alargamiento de los músculos. (1,7,9).

Desde el punto de vista químico, las proteínas son sustancias cuaternarias - complejas de alto peso molecular, formadas en su mayoría por alfa-aminoácidos - ligadas por uniones peptídicas. Están compuestas por carbono, hidrógeno y oxí-- geno, así como de nitrógeno y azufre. A menudo se encuentran otros elementos -- como cobalto, hierro, zinc y fósforo. La importancia dentro de su composición - estructural es que las proteínas están formadas por la unión de alfa-aminoácidos. (1,5,9).

La clasificación de las proteínas está basada en sus propiedades físicas o -- bien en sus características de composición. Fundamentalmente las proteínas pue-- den clasificarse de acuerdo a los siguientes conceptos: proteínas simples las - que solo contienen alfa-aminoácidos y sus derivados, las proteínas conjugadas - son las que tienen alfa-aminoácidos y sus derivados (fosfoproteínas) y las -- proteínas derivadas que son el resultado de la degradación de los dos tipos an-- teriores. (1,5).

La condensación de dos ó más aminoácidos por medio de sus dos grupos COOH y -NH produce compuestos con propiedades características que se denominan péptidos.
 2 Las proteínas están constituidas por numerosos aminoácidos agrupados en cadenas polipeptídicas para formar moléculas de gran tamaño. Numerosas propiedades biológicas de las proteínas dependen de su gran tamaño y de la forma y de la forma de sus moléculas, algunas tienen formas alargadas mientras que otras son de forma esferoidal. Existen métodos para especificar la forma y el tamaño de las proteínas, dentro de las cuales el que ha dado mayores resultados es el análisis por rayos X en el cuál la longitud de onda de los rayos X es del orden de magnitud de las distancias interatómicas; por ésta razón, si se emplea a modo de la luz de un microscopio óptico, es posible obtener resoluciones de las estructuras atómicas situadas en el interior de las moléculas. Cuando un haz de rayos X choca con un cristal implica la repetición periódica y ordenada de los átomos que componen la unidad fundamental. Con la ayuda de los rayos X se han analizado tanto proteínas globulares como en su forma cristalizada. Las proteínas desnaturalizadas que se encuentran en estado amorfo se han analizado por este método. Entre las grandes proezas en la Química se encuentra el estudio por rayos X de la mioglobina y de la hemoglobina cuya estructura fué determinada por éste método. (5,8,11,12,20,21).

Más recientemente se ha encontrado un notable parecido en la estructura de la mioglobina y la hemoglobina de caballo, con lo cuál ha sido posible determinar perfectamente la estructura de la hemoglobina humana, así como efectuar distintos ensayos y pruebas para conocer su comportamiento y sus funciones. (2,21),

1.2 ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA.

La hemoglobina es el compuesto más importante en la vida del eritrocito, es una proteína que en los vertebrados funciona como portadora de oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos. La presencia de hemoglobina en el organismo incrementa 70 veces aproximadamente la capacidad portadora de oxígeno en la san-

La hemoglobina tiene un peso molecular de 64,450 daltons, es una molécula -- globular que está constituida por 4 subunidades, de las cuáles cada una contiene la mitad de una unidad hem conjugada a un polipéptido. El grupo hem es un -- derivado porfirínico que contiene hierro. La porción globina es aquella que está constituida por los polipéptidos que contienen dos unidades de un tipo y -- otras dos de otro tipo diferente. (8,9;10,18,22).

La hemoglobina normal en el adulto es llamada hemoglobina A ¹, la cuál se encuentra constituida por dos pares de cadenas alfa y beta. La cadena alfa se --- forma por 141 aminoácidos de un orden bien determinado que inicia con valina-- y concluye con arginina. En cuanto a la cadena beta, ésta posee 146 aminoácidos iniciando también con valina pero del otro extremo termina con histidina. Las - cadenas alfa tienen un peso molecular de 15,750 daltons y las beta de aproximadamente 16,500 daltons, la disposición de las subunidades se conoce como estructura cuaternaria. (5,8,11,20).

Otros tipos de hemoglobina tales como la hemoglobina fetal HbF está formada-- por dos pares de cadena pero en este caso son dos cadenas beta y dos gama; en - el caso de la hemoglobina A ² contienen también dos pares de cadenas, las prime-- ras son beta y las segundas delta, esta hemoglobina se encuentra presente en el humano pero en menor proporción que la A ¹. (4,7,8).

La hemoglobina es una de las proteínas que presenta una estructura helicoidal, es decir en forma de hélice. En el espacio de acuerdo a estudios de rayos-- X las distancias para las unidades de -C-N son de 1.32 A y de 1.54 A para las - unidades de -C-C- las formas de hélice se establecen a lo largo de la cadena -- y la posición de un aminoácido con respecto al otro queda angulada a unos 100 ^o; ésta angulación requiere de un espacio de 1.5 A y forma un cilindro en cuyo -- borde, como espiral se disponen los aminoácidos unidos entre sí por puentes de hidrógeno. El puente de hidrógeno se forma siempre que un átomo de hidrógeno -- ó de nitrógeno con un par de electrones libres, se acerque a un grupo en el que existe un protón H ⁺, unido debilmente al resto de la molécula. Así en las pro-

teínas, muchos de los puentes de hidrógeno se establecen entre grupos $-C=O$ de una cadena peptídica y los $NH-$ de otra cadena vecina. (5,8).

La cadena peptídica, cuando está extendida, adquiere una forma de zig-zag y es denominada cadena beta, esta estructura se aplica a una disposición en que las cadenas de polipeptidos extendidos forman una estructura de tipo laminar en las cuáles unas se sostienen firmemente a las otras gracias a la presencia de puentes de hidrógeno. El hecho de que las proteínas estén formadas por partes helicoidales las hace muy irregulares. La disposición final depende de los distintos residuos de aminoácidos, pues en algunos forman con más facilidad ciertas uniones por puentes de hidrógeno, por unión de residuos similares o por fuerzas de Van der Waals. (1,9).

Se entiende por estructura cuaternaria el agrupamiento ó polimerización de las cadenas polipeptídicas para formar proteínas más complejas. El grupo hemo se acomoda en una especie de cavidad rodeada de los grupos hidrofóbicos de los aminoácidos vecinos, y unidos a los grupos imidazólicos de las histidinas. Por lo tanto queda integrada una molécula altamente hidrofóbica en su interior con baja constante dieléctrica lo que le impide captar el oxígeno, sin que cambie la valencia del hierro; y muy hidrofílica en su exterior, lo que le confiere propiedades de gran solubilidad y carga. (8,11,18).

El grupo hemo se considera formado por cuatro subunidades pirrólicas unidas por enlaces metileno.

La hemoglobina se considera una cromoproteína debido a que posee color y este hecho permite su estudio desde el punto de vista de absorción, específicamente en las longitudes de onda de 400 a 632 nm. Otra de las denominaciones usuales es que se encuentra en el grupo de sustancias metaloproteicas, ya que el núcleo porfirínico se combina con gran facilidad a un metal, en este caso el hierro. El hierro es un elemento electricamente neutro que puede pasar a la forma iónica perdiendo dos electrones y como éstos poseen carga eléctrica negativa, se convierte en Fe^{++} , o sea ión ferroso. El mismo hierro puede perder tres

tres electrónes y quedar por lo tanto como ión férrico que se encuentra más --- oxidado; ambos iones tienen un número de coordinación 6, por lo mismo poseen -- una tendencia a formar complejos de coordinación hexavalentes, por medio de la combinación de seis átomos para formar sustancias estables. Cuando se unen al núcleo porfirínico, en el caso del Fe^{++} , cuatro de las uniones se establecen en los nitrógenos de los anillos pirrólicos de la porfirina; quedan por lo tanto - dos sitios de coordinación, que en este caso se establecen utilizando uniones - con otros distintos grupos que son electricamente neutros, entre los que se destacan el imidazólico de la histidina cuando se une a la globina para formar la hemoglobina. (1,9,18).

Cuando el hierro se encuentra en forma férrica, el que forma el complejo de coordinación en primera instancia se combina con los cuatro nitrógenos de los - pirroles y posteriormente con dos átomos más, sin embargo como tiene una carga positiva más, queda una carga libre que habitualmente forma unión de tipo iónico con radicales negativos tales como OH^- , CN^- , con lo cual se reestablece la - neutralidad eléctrica. (1,8,20).

Cuando se combina una porfirina, la protoporfirina IX con el hierro en su -- forma ferrosa, se encuentra la ferroprotoporfirina IX que se denomina habitualmente grupo hemo; la combinación de la protoporfirina con el hierro en estado - iónico férrico produce la hemina. El grupo hemo libre es muy inestable y se oxida fácilmente para pasar a su forma férrica ó hemina. Tanto la ferroprotoporfirina IX (hemo) como la ferriprotoporfirina (hemina) suelen combinarse con - la protefna simple llamada globina para la formación de la hemoglobina. (1,9)

Entre las situaciones más factibles de unión entre la globina y el grupo -- hemo está la formada por dos valencias de hierro que se unen a los nitrógenos - de las histidinas dentro del grupo imidazólico. (1,9).

1.3 LA HEMOGLOBINA EN LA QUIMICA DE LA RESPIRACION.

Se denomina respiración al intercambio de oxígeno y dióxido de carbono que - se lleva a cabo entre el organismo y el medio que lo rodea. En la mezcla de ga-

ses del aire, cada gas ejerce su propia presión parcial. Se sabe que al llevarse a cabo la inspiración los gases del aire se ponen en contacto con la pared de los alveolos pulmonares, el intercambio entre ellos tiene lugar de acuerdo con las leyes físicas habituales de la difusión, lo que quiere decir que un gas difundido a través de la pared alveolar a la sangre o bien en sentido inverso, de acuerdo a la diferencia de presiones, que ejerza ese gas en particular en ambos lados de la pared. Habitualmente las presiones de un gas son expresadas como tensiones. El intercambio de gases entre el aire alveolar y la sangre puede expresarse de la siguiente forma:

Tensión de oxígeno del aire alveolar: 107 mm de Hg.

Tensión de oxígeno en la sangre venosa: 40 mm de Hg.

La diferencia de 67 mm de Hg. que existe en la presión es la que ocasiona que el oxígeno difunda de la pared alveolar a la sangre.

Tensión de dióxido de carbono en el aire alveolar: 36 mm de Hg.

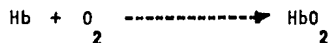
Tensión de dióxido de carbono en la sangre venosa: 46 mm de Hg.

Esta diferencia de 10 mm de Hg. es la necesaria para hacer que el dióxido de carbono difunda desde la sangre hacia el aire alveolar.

En el caso del nitrógeno (gas componente de aire que se encuentra en un 79%) la tensión es la misma en la sangre venosa como en el aire alveolar que es de 570 mm de Hg., por lo que se considera fisiológicamente inerte. (1,9,11).

Al ocurrir el intercambio gaseoso, la sangre se convierte en sangre arterial y ésta tiene una tensión de oxígeno de mas o menos 100 mm de Hg. y una tensión de dióxido de carbono de 40 mm de Hg.

La función principal de la hemoglobina es el transporte de oxígeno por la sangre. Este transporte se lleva a cabo por la capacidad que tiene la hemoglobina para combinarse con el oxígeno en forma reversible lo cual puede presentarse de la siguiente manera:



Lo cual quiere decir que la hemoglobina reducida combinada con oxígeno forma -

oxihemoglobina. La formación de éste compuesto puede considerarse mas bien como una unión laxa ó débil que como una combinación química ya que la disociación de la oxihemoglobina para liberar oxígeno se ve determinada por la tensión de oxígeno en el medio que rodea a la hemoglobina. La relación que existe entre la saturación de la hemoglobina y la tensión de oxígeno puede determinarse muy claramente examinando una curva de disociación de oxihemoglobina en la que se expresa fácilmente el porcentaje de saturación contra tensión de oxígeno. Esta tensión de oxígeno y por lo tanto la curva de saturación se ve afectada por la tensión de dióxido de carbono. La curva de saturación que se obtiene con una tensión de dióxido de carbono de 40 mm de Hg. se considera representativa de condiciones fisiológicas normales y al mismo tiempo la tensión de oxígeno en la sangre arterial es de 100 mm de Hg. La hemoglobina se satura en un 95-98%; es decir, que existe una formación casi completa de oxihemoglobina. Al ir disminuyendo la tensión de oxígeno cae alrededor de 50 mm de Hg. a partir de ese momento hay una rápida liberación de oxígeno. En los tejidos donde la tensión de oxígeno se encuentra entre 40 mm de Hg. (que es mas o menos la tensión de descarga de la hemoglobina) la oxihemoglobina se disocia para donar facilmente oxígeno a las células. (1,7,9,11).

Transporte de dióxido de carbono por la sangre. Como se sabe el CO_2 es transportado por las células y por el plasma sanguíneo; el contenido de CO_2 de la sangre arterial es de 50-53% en el volumen. El CO_2 se encuentra principalmente en tres formas: la primera es como ácido carbónico en muy pequeña cantidad, la segunda es como CO_2 carbamínico que se transporta con la hemoglobina y la tercera forma es como bicarbonato el cuál se encuentra en combinaciones con iones como sodio y potasio. El CO_2 que se encuentra en combinación con la hemoglobina es alrededor de un 20% del dióxido de carbono total. La reacción que se lleva a cabo con la hemoglobina es la siguiente:



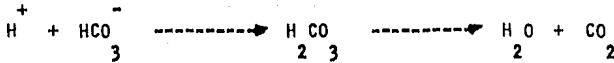
Como se note en la reacción se encuentra un grupo amino libre que se combina

con el CO_2 para formar un compuesto carbamínico. En la sangre el CO_2 se convierte en ácido carbónico, de manera que su mecanismo de transporte entraña una gran eficiencia para impedir cambios de pH y movilizar volúmenes de gas. (1,9).

La hidratación de dióxido de carbono para formar ácido carbónico es muy lenta, pero en los eritrocitos el CO_2 es rápidamente hidratado por la acción de la enzima anhidrasa carbónica que tienen actividad reversible. Debido al pH de la sangre todo el ácido carbónico se ioniza a HCO_3^- y H^+ . Por la alta actividad de la enzima, la deshidratación del ácido carbónico sucede en breves instantes lo cual origina la liberación del CO_2 al pasar la sangre a través de los tejidos, facilitando la captación del CO_2 por los tejidos. Cuando la sangre venosa pasa por los capilares de los pulmones, el CO_2 proveniente casi en su mayoría por los eritrocitos, debido a la acción de la anhidrasa carbónica, convierte el HCO_3^- en CO_2 . (1,7,18).

Existe un efecto amortiguador por parte de la hemoglobina dentro de estos procesos y se debe a la presencia del grupo imidazólico que forma parte del aminoácido histidina. La histidina está unida al grupo hemo, que es el grupo prostético de la hemoglobina, por lo tanto las relaciones electrónicas entre una y otra son muy estrechas. Cuando el grupo hemo capta oxígeno; el rearrreglo electrónico consecutivo extiende su influencia hacia el radical imidazólico y los electrones de éste. O sea que al captar el oxígeno la hemoglobina permite la liberación más fácil de un protón del grupo imidazol de la histidina; por lo tanto la hemoglobina oxigenada es un ácido más fuerte que la hemoglobina no oxigenada puesto que tienen mayor tendencia a liberar un protón, en esto se basa la notable capacidad amortiguadora de la hemoglobina. (1,7,9).

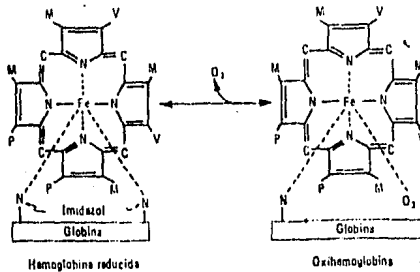
En los pulmones, la formación de oxihemoglobina de la hemoglobina reducida pone en libertad iones de hidrógeno que reaccionan con el bicarbonato para formar ácido carbónico. Debido a la baja tensión de CO_2 en los pulmones, el equilibrio se ve desviado hacia la producción de dióxido de carbono que se elimina en el aire espirado.



En los tejidos donde la tensión de oxígeno es más reducida se disocia la hemoglobina formando hemoglobina reducida y suministrando oxígeno a las células. Al mismo tiempo el CO_2 que se produce en el curso del metabolismo penetra a la sangre donde se hidrata formando ácido carbónico que después se ioniza dando H^+ y HCO_3^- . La hemoglobina ácida reducida, con lo que ocurre un ligero cambio de pH debido a que los iones hidrógeno son amortiguados por la formación de un ácido muy débil con lo cual se suprime la ionización del hidrógeno.

Cuando la sangre vuelve a los pulmones y hay formación de un ácido más fuerte, los iones hidrónico son liberados y neutralizados con la formación de HCO_3^- que es la reacción indispensable para la liberación de CO_2 en los pulmones. (1,4,7,9,18).

Estructuras de la Hemoglobina Oxidada y Hemoglobina Reducida.



1.4 BIOSINTESIS Y METABOLISMO.

Biosíntesis del núcleo porfirínico. La biosíntesis se lleva a cabo partiendo de la unión de la glicina y el ácido succínico. El nitrógeno alfa-amino de la glicina y sus otros dos carbonos, junto con los del ácido succínico intervienen en la formación de los grupos pirróli. La unión del succinato y la glicina se lleva a cabo a través del ciclo metabólico en el que se une el carbono alfa de la glicina para formar el ácido alfa-amino-cetadiférico que es un compuesto intermedio que se descarboxila para la formación del ácido delta-amino-levulínico (ALA), esta condensación requiere de vitamina B₆ y se lleva a cabo en las mitocondrias. Existe un rearrreglo intramolecular en donde dos moléculas de este ácido se unen para formar un monopirróli llamado porfobilinógeno. Con la unión de cuatro moléculas de porfobilinógeno se forma uroporfirinógeno, que al descarboxiliarse se convierte en coproporfirinógeno. La descarboxilación y oxidación consecutiva de éstos establece la estructura de los protoporfirinógenos que se oxidan para dar porfirina; ésta proteína suele encontrarse en los eritrocitos ya maduros. El hierro se incorpora en la molécula de protoporfirina mediante la enzima mitocondrial llamada ferro-quelataza y así se forma la molécula de hemo completa. (1,5,9,11,18).

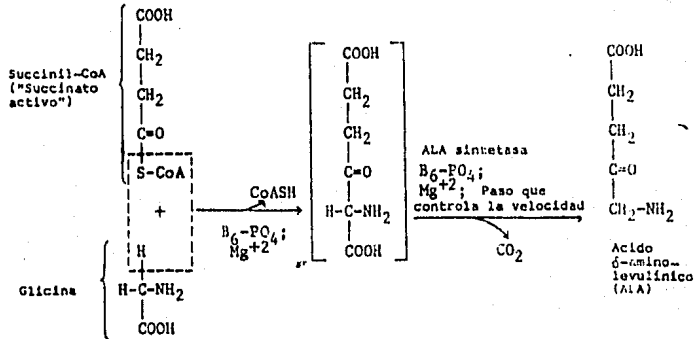
Síntesis de la globina. Esta síntesis se efectúa en el citoplasma de las células de la serie roja. Las pequeñas moléculas de RNA soluble se unen a cada aminoácido determinado en cada lugar según el código de RNA mensajero. El crecimiento de la cadena de polipéptidos se inicia a partir del grupo amino final. Es muy factible que las cadenas de polipéptidos se doblen espontáneamente para formar la estructura o configuración tridimensional. Las cadenas alfa y beta de la hemoglobina se hayan evidentemente bajo el control de ciertos genes, pero se sintetizan a la misma velocidad. (1,18,20).

El hierro que se libera al destruirse la hemoglobina así como el que se absorbe con los alimentos, se encuentra almacenado como ferritina que no es más que hidróxido de hierro combinado a una proteína llamada apoferritina. El hie-

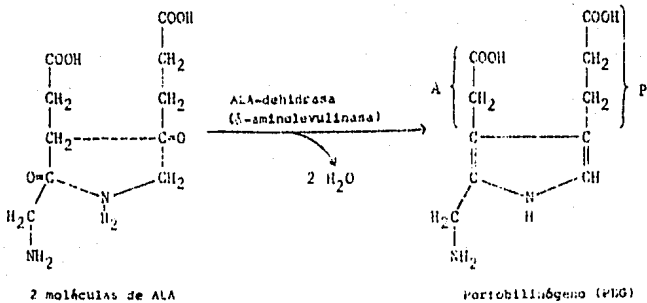
ro se absorbe en el duodeno y en las primeras porciones del intestino delgado; en la mucosa intestinal se oxidan los iones ferrosos y pasan a su forma férrica. El hierro en su forma férrica circula por el plasma unido a la proteína llamada albúmina beta-1 también llamada transferrina que suministra la capacidad de fijación del hierro. (1,18).

Reacciones para la Biosíntesis de la Hemoglobina.

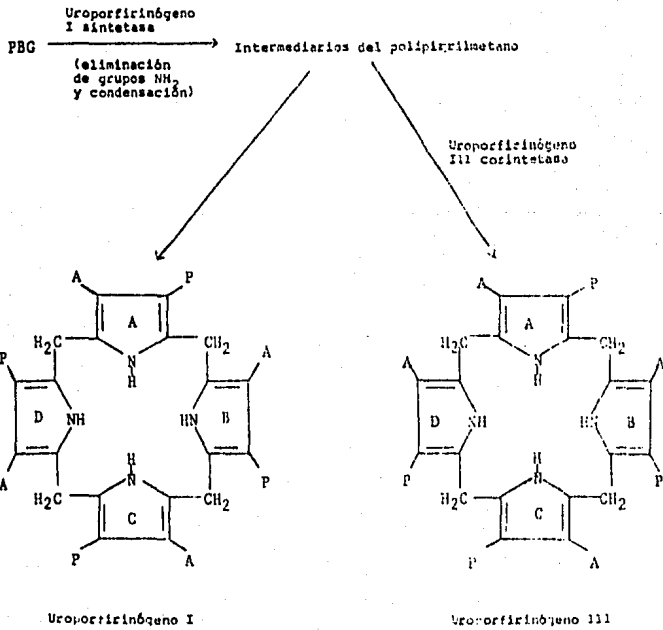
Formación de ácido δ-aminolevulínico (ALA)



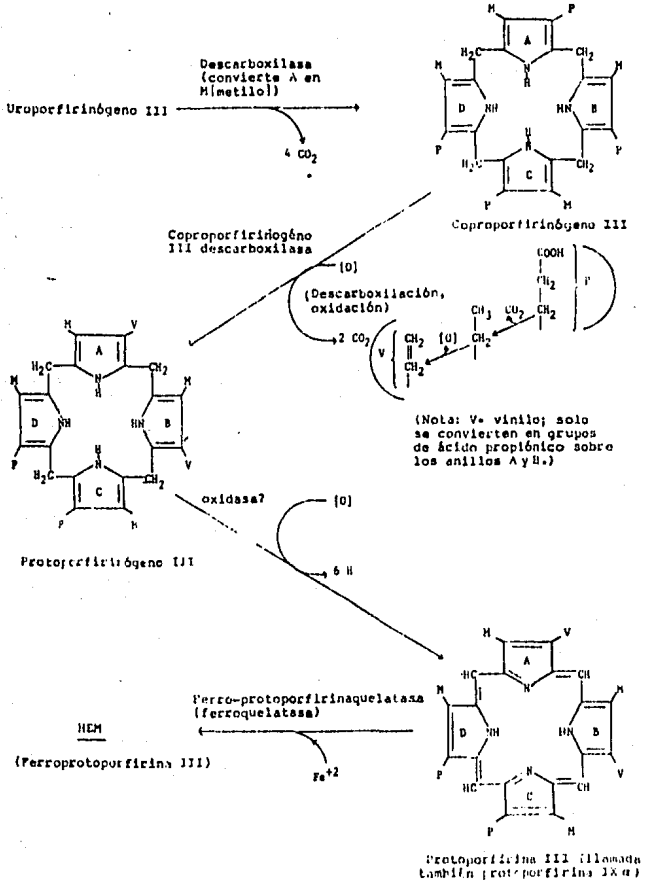
2. Formación de porfobilinógeno (PBG)



Síntesis de uroporfirinógenos de tipos I y III



4. Síntesis de la protoporfirina III y del hem



Metabolismo. Desde el momento en que el glóbulo rojo pierde su RNA, sufre gradualmente cambios metabólicos a lo largo del trayecto de su vida (120 días) es entonces cuando se considera una célula vieja, y por lo tanto retirada de la circulación. También ciertas enzimas glucolíticas van decreciendo en su actividad lo que origina cambios en la superficie de la célula por lo que es propensa a la fagocitosis. Las células son eliminadas por macrófagos del sistema reticuloendotelial. (1,9,18).

Debido a que el eritrocito se encuentra fuera de circulación la hemoglobina se desintegra dentro de las células del sistema reticuloendotelial en tres constituyentes, los cuales son: la globulina, el hierro y la protoporfirina. El hierro queda depositado y puede ser empleado otra vez; las cadenas de polipéptidos que constituyen a la globulina son degradadas y regresan a la reserva de aminoácidos del organismo. El grupo hemo al perder el hierro da lugar a una serie de sustancias coloridas que por su excreción en bilis se denominan pigmentos biliares. (9,18).

1.5 CARACTERISTICAS Y VALORES CLINICOS.

Como ya se explicó anteriormente, la hemoglobina es una proteína constituida por cuatro cadenas de polipéptidos a cada uno de los cuales se unen a un grupo-hemo. Las hemoglobinas normales difieren según la etapa de desarrollo del individuo. Hay tres hemoglobinas embrionarias: Portland - , Gower -1 (E_{α}), y Gower -2 (F_{β}); dos hemoglobinas fetales: HbF (A_{α}) y HbF₁ - , y varias hemoglobinas adultas tales como: HbA₁, HbA₂. Existen otros subtipos que se encuentran unidos a glicoles tal es el caso de la hemoglobina HbA₃, que no es más que la hemoglobina HbA₁ unida a glutatión oxidado. El enfoque del laboratorio para diagnosticar las hemoglobinas normales es el mismo que el utilizado para el diagnóstico de las hemoglobinas anormales. Las hemoglobinas se analizan con la ayuda de diversos métodos que pueden ser electroforéticos, cromatográficos ó -

espectrofotométricos. La metodología puede dividirse en la cuantificación e identificación preliminar de la hemoglobina; y la confirmación de la identificación de la hemoglobina por medio de ensayos de pureza. (4,6,10,11).

La concentración de la hemoglobina se expresa en gramos por mililitro de sangre o bien en gramos por decilitro. Para considerar una prueba aceptable del laboratorio clínico deben tomarse en cuenta los siguientes parámetros: precisión de una sola determinación en comparación de un prototipo conocido, reproducibilidad de la determinación, velocidad tomándose en cuenta desde el punto de vista de disponibilidad en un caso de emergencia y también la sencillez del método considerando su bajo costo. (4,15).

Los métodos usualmente empleados para la determinación de la hemoglobina son los colorimétricos y entre ellos pueden mencionarse los siguientes: Método de la Hematina Ácida, Método de la Hematina Alcalina, Método de Oxihemoglobina y el método que actualmente es considerado de elección el Método de la Cianometahemoglobina. También como se explicó existen métodos gasométricos como la prueba de capacidad de oxígeno de Van Slyke; también existen métodos químicos con los cuales se mide su contenido de hierro.

Se han reportado en tablas los siguientes valores normales:

Capacidad de oxigenación de

la sangre 1.34 cc por gramo

Contenido de hierro de la

hemoglobina 0.334 g por 100 g de Hb

La hemoglobina constituye

aprox. en el eritrocito un 34 %

La hemoglobina constituye

aprox. en el peso de un eritrocito desecado 85 %

Usualmente los valores en sangre total deben encontrarse dentro de los siguientes límites normales: (4,9,18).

Mujer 12 - 16 g / dl.
 Hombre 13.5 - 18 g / dl.

1.6 TIPOS DE HEMOGLOBINAS.

Los glóbulos rojos de un individuo pueden poseer dos ó tres especies moleculares distintas de hemoglobina. Por ejemplo el feto de una especie de animal animal produce un tipo diferente de hemoglobina que el mismo animal en su estado adulto. En algunos casos de anemia se ha observado la formación de hemoglobina fetal la cual normalmente ha desaparecido a cierta edad. La presencia en el organismo de ciertos tipos de hemoglobina puede verse acompañada de distintas anomalías en la morfología de los hematíes así como de manifestaciones clínicas bien definidas. Las diferencias químicas entre las hemoglobinas se determinan identificando el orden en que están colocados los aminoácidos de las globinas. Primeramente se hicieron estudios de las estructuras componentes de las globinas utilizando para ello la tripsina proteolítica que es una enzima lítica que fragmenta las cadenas del polipéptido en los lugares ocupados por los residuos de lisina ó arginina; después estos fragmentos se separan por cromatografía; se utilizan métodos electroforéticos para promover su polaridad. (4,14,28,29).

Entre las hemoglobinas normales podemos citar las siguientes: HbA que es la más importante de las hemoglobinas y se encuentra en el adulto normal; la hemoglobina fetal HbF que es la que se encuentra presente en el feto y en el recién nacido; la hemoglobina HbA₂ que constituye la hemoglobina del adulto de un 1.5 a 3.5 % de la hemoglobina total; las hemoglobinas embrionarias o del tipo Gower-1 y Gower-2 que se encuentran en los fetos humanos normales que tienen un período de gestación de aproximadamente tres meses.

En cuanto a las hemoglobinas anormales la mayoría provienen de una sustitución de un aminoácido por otro, en una de las cadenas polipeptídicas; pero también en algunos casos puede deberse a una alteración en la constitución de la hemoglobina debido al tipo de cadenas polipeptídicas que integran el tetrámero-

se han encontrado casos raros como el de la hemoglobina formada por cuatro cadenas beta, también algunos individuos al inicio de su vida hemoglobina con cuatro cadenas gamma (1,7,9,18).

1.7 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA.

Existen razones, propósitos y necesidades para efectuar un estudio de estabilidad. La primera razón es de tipo sanitario debido a la necesidad de determinar si los productos de degradación de un fármaco son o no tóxicos. Otra razón es de tipo legal, ya que la ley exige que un producto cumpla con las condiciones de identidad, efectividad, potencia, pureza e inocuidad durante el período que se encuentra en el mercado y hasta el momento de ser empleados.

Por lo dicho anteriormente se hace necesario indicar lo que se conoce como fecha de vencimiento. Los factores que pueden alterar un producto con el tiempo son: temperatura, radiaciones, humedad, oxígeno u otros gases atmosféricos, presión, solventes, cambios de pH, interacciones, contaminación microbiana, etc. Generalmente los procesos de degradación son reacción química que consumen energía y pueden acelerarse por aumento de la temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta esta hecho y se basan en la velocidad de degradación a temperaturas superiores a la normal, para después inferirlo que sucedería a temperatura ambiente. (25,27).

La cinética de reacción es indispensable para los estudios de estabilidad ya que por objetivos tiene los siguientes: obtención experimental de datos cinéticos, correlación de los mismos por ecuaciones matemáticas, proponer un mecanismo de reacción, establecer las condiciones para acelerar o disminuir la velocidad de reacción.

Se conoce como velocidad de reacción la velocidad con la cual cambia la concentración de una sustancia que interviene en dicha reacción. La sustancia en cuestión puede ser un reactivo ó un producto de dicha reacción. Es de sumo interés para la cinética determinar los cambios por los cuales se puede llegar del estado inicial al final. En la reacción:



A y B se consideran los reactivos y C el producto. Por lo tanto la velocidad de reacción puede definirse como la velocidad de separación de A ó bien de B; - también en cuanto al producto puede determinar la velocidad de aparición del mismo (C).

Esto puede esquematizarse de la siguiente manera:

$$v = \frac{-d(A)}{dt} = \frac{-d(B)}{dt} = \frac{d(C)}{dt}$$

Orden de reacción. Se denomina orden de reacción al concepto basado en mediciones cinéticas, y se refiere al número de moléculas de cuya concentración depende la velocidad de reacción. (25,27).

Una reacción de orden cero es aquella en la cual la velocidad de reacción es independiente de la concentración de los reactivos. La ecuación matemática que indica esta independencia es:

$$v = k$$

Si se llamara " x " a la concentración inicial puede abreviarse de la siguiente forma:

$$\frac{-dx}{dt} = k \quad \text{ó} \quad -dx = k dt$$

Para formar la ecuación integrada se usan los límites de la concentración -- inicial C_0 y de la concentración tomada al tiempo " t ".

$$- dx = k dt$$

$$-\int_{C_0}^C dx = k \int_0^t dt$$

$$C = C_0 - kt$$

$$k = \frac{C_0 - C}{t}$$

La representación de la concentración en función del tiempo, en una reacción de orden cero, es una recta cuya pendiente es la constante de la velocidad de reacción ($-k$) y la ordenada al origen es la concentración inicial (C_0).

En una reacción de primer orden la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de reactivos. En su forma general la expresión de velocidad de reacción de primer orden será:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

En una reacción de segundo orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de los reactivos o bien a la segunda potencia de uno de ellos, lo que se señala de la siguiente forma:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$$

La inversa de la concentración está en función del tiempo y es una recta de pendiente " k " y de ordenada al origen $\frac{1}{C_0}$.

Tiempo de vida media y tiempo al 90%. Dentro de los estudios de estabilidad es muy común encontrar este dato, en lugar del valor de la constante de velocidad de reacción, llamado tiempo de vida media. Recibe este nombre porque es el tiempo en que la concentración del producto se encuentra en un 50 % en cuanto al valor inicial. El tiempo al 90% se refiere a cuanto la reacción ha avanzado un 10 % en su degradación. (25,27).

Método de Arrhenius. Llamado también método de Garrett, la reacción cuantitativa entre velocidad de reacción y temperatura dada por la ecuación de Arrhenius

es :

$$k = A e^{-\Delta H/RT}$$

$$\ln k = \ln A - \frac{\Delta H}{RT}$$

Donde ΔH es la energía de activación, A es una constante, R es la constante de los gases, y T es la temperatura absoluta. Para una aplicación correcta del método de Arrhenius debe tomarse en cuenta las siguientes consideraciones: seguridad en el orden de reacción, exactitud en la determinación de las temperaturas, ya que es de suma importancia que la determinación de las concentraciones del producto se hagan a la temperatura establecida inicialmente para evitar datos erróneos. (25,27).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De los problemas a los que se enfrenta la ENEP Zaragoza está el de adquirir reactivos de Importación, uno de estos productos es el patrón de hemoglobina -- llamado comercialmente Acoglobin , el cual por su uso continuo en los labora-- torios de Análisis Clínicos de las Clínicas Multidisciplinarias de la UNAM tie-- ne gran demanda. El problema a resolver consiste en obtener un patrón de hemo-- globina de concentración conocida y establecer las normas del material de em-- paque y control de calidad adecuadas, acordes con un procedimiento óptimo y -- económico a los que existen reportados y que permitan con la infraestructura - existente en nuestro plantel suprimir su compra.

3. OBJETIVOS.

3.1 Obtención de un patrón de hemoglobina de concentración conocida.

3.2 Acondicionamiento de dicho patrón como producto terminado.

3.3 Ejecución de pruebas de Estabilidad Acelerada para determinación de fecha de caducidad.

3.4 Con base en los resultados obtenidos establecer condiciones de fabricación, acondicionamiento, así como los parámetros de control de calidad para la producción de diversos lotes dentro de la Planta Piloto de Tecnología Farmacéutica de la ENEP Zaragoza y su abastecimiento a los Laboratorios de Análisis Clínicos.

4. HIPOTESIS.

El Patrón de Hemoglobina obtenido en la ENEP Zaragoza tendrá las características biológicas, químicas y de calidad comparables a los estándares comerciales de hemoglobina.

5. MATERIAL Y METODOS.

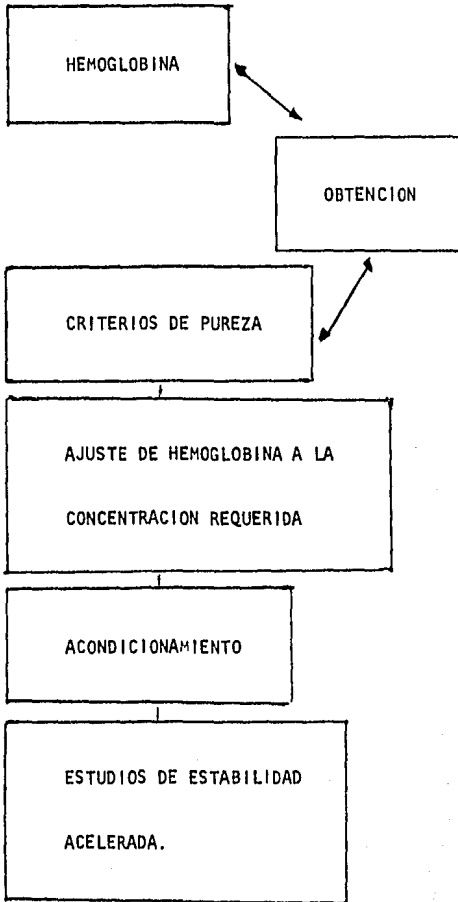
5.1 EQUIPO.

- Espectrofotómetro de Absorción Beckman Model 25.
- Graficador Beckman Recorder Model 25.
- Columna para Cromatografía Column k-16 Pharmacia Fine Chemical.
- Colector de Fracciones LKB bromma 2112-redirarc.
- Centrífuga Clínica Batsol Modelo 12.
- Refrigerador American A-2.
- Engargolador Vechl.
- Equipo de Electroforesis.
- Incubadoras.
- Tubos de Ensaye de 13 x 100 Pyrex.
- Frascos viales de color ámbar de 8 ml.
- Tapones de hule siliconizados.
- Sellos de Aluminio.
- Pipetas graduadas y volumétricas de 5 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Pipetas de Sahi de 0.02 ml.

5.2 REACTIVOS.

- Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 N de pH = 7.4
- Reactivo de Drabkin.
- Acido de Sodio 0.1 N.
- Solución Salina isotónica
- Tolueno.
- Reactivo de Biuret.

DIAGRAMA DE METODOS DE OBTENCION DE UN PATRON DE HEMOGLOBINA



5.3 METODOS.

5.3.1 Preparación del gel y empaquetamiento de la columna.

Fundamento.- Se denomina filtración por gel a la técnica de separación de moléculas de diferente tamaño mediante su paso a través de una columna de gel ; el método se basa en la propiedad que tiene el Sephadex de excluir los solutos de peso molecular grande, mientras que es accesible para la difusión de moléculas de pequeña dimensión. (2,3,13,14,23).

Procedimiento.

1.- Pesar la cantidad necesaria de los geles Sephadex G-100 y G-200 (proporción 1 g. en 20 ml. de líquido para reconstituir).

2.- Hidratar con solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 utilizando la necesaria para reconstituir el gel.

3.- Hidratar el gel reconstituido por 80 hrs. a la temperatura ambiente.

4.- Deaírear la suspensión con ayuda de vacío para la eliminación de burbujas.

5.- Empaquetar una columna de Cromatografía de 60 cm. x 1 cm.

Nota.- En caso de formación de burbujas al empaquetar la columna, golpear ligeramente con una varilla de vidrio en el sitio donde se encuentren las burbujas. de no desaparecer éstas, vaciar la columna y deaírear.

5.3.2 Calibración de la Columna.

Una vez empaquetada la columna se procede a su calibración para la determinación del volumen de exclusión y corroborar la resolución del gel a utilizar.

1.- Colocar 1 ml de Azul dextrán con la ayuda de una pipeta Pasteur en la superficie de la columna.

2.- Eluir la muestra con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 N pH = 7.4

3.- Colocar un tubo graduado y recolectar el volumen hasta que salga la primera gota de colorante (Volumen de Exclusión).

4.- Cambiar el tubo y recolectar hasta la última gota de colorante.

Calibración con Citocromo C.

- 1.- Colocar 1 ml. de muestra de Citocromo C en la superficie de la Columna.
- 2.- Eluir la muestra con solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 N pH = 7.4.
- 3.- Colectar el volumen de exclusión correspondiente a la muestra de Citocromo en diferentes fracciones.
- 4.- Efectuar las lecturas de las fracciones al Espectrofotómetro en la región del visible (540 nm.) para determinar la curva de absorción.

Calibración con Citocromo C y Albúmina Humana.

- 1.- Eluir la mezcla de 1 ml. de Citocromo C y 1 ml. de Albúmina Humana con solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 N pH = 7.4.
- 2.- Efectuar la recolección de distintas fracciones tomando en cuenta el volumen de exclusión de la columna.
- 3.- Determinar las lecturas espectrofotométricas para definir las curvas de absorción tanto del Citocromo C como de la Albúmina Humana.

Calibración con Citocromo C, Albúmina Humana y Albúmina de Huevo.

- 1.- Colocar la mezcla de 1 ml. de Citocromo C, más 1 ml. de Albúmina Humana más 1 ml. de Albúmina de Huevo.
- 2.- Eluir la muestra con solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 N pH = 7.4.
- 3.- Colocar las fracciones correspondientes a cada uno de los componentes de la muestra en diferentes tubos.
- 4.- Determinar la curva de absorción de cada componente.

5.3.3 Preparación de la Muestra.

Para la determinación y obtención de la Hemoglobina se utiliza un "pool" de eritrocitos partiendo de sangre total.

Técnica.

- 1.- Lisar los eritrocitos con un volumen igual de agua destilada.
- 2.- Centrifugar la muestra a 5 000 r.p.m. y separar el sobrenadante.
- 3.- Preparar la muestra con 2 ml. de sobrenadante y con 10 ml. de Azida de -

sodio 0.01 M.

4.- Colocar los 2 ml. de la muestra en la superficie de la columna y eluir con solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 N pH = 7.4.

5.3.4 Obtención de la Hemoglobina.

Técnica.

1.- Colectar los volúmenes de la Columna con la ayuda de un colector de fracciones ajustándolo a 18 gotas por minuto.

2.- Desechar los primeros mililitros de solución incolora.

3.- Efectuar a partir del primer tubo colorido la recolección de las distintas fracciones tomando en cuenta la franja muy colorida correspondiente a la Hemoglobina.

4.- Trabajar una vez recolectadas las diferentes fracciones de la siguiente manera:

Determinar las Proteínas Totales por el Método de Biuret.

Fundamento.- Las proteínas dan coloración violeta en presencia de iones cúpricos en solución alcalina, proporcional a la cantidad de proteínas totales. La reacción es del enlace peptídico de las proteínas. (1,4,15).

Técnica.

1.- Colocar en un tubo de ensaye 9.5 ml. de cloruro de sodio al 0.85 % y 0.5 ml. de la muestra a analizar.

2.- Poner en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. 2 ml. de la muestra diluida.

3.- Colocar en otro tubo de ensaye de 13 x 100 mm. que servirá de blanco 2 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.85 % .

4.- Agregar a cada tubo 8 ml. de Reactivo de Biuret y mezclar por inversión.

5.- Dejar reposar 30 min. a temperatura ambiente y leer una longitud de onda de 540 nm.

6.- Ajustar a 100 % de transmitancia y a 0 de Absorvancia con un blanco de reactivos.

Determinación de cianometahemoglobina por el Método de Drabkin.

Fundamento.- La hemoglobina es transformada en cianometahemoglobina mediante la adición de ferrocianuro de potasio y cianuro de sodio. La densidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina presente. El ferrocianuro convierte el hierro ferroso de la hemoglobina en férrico para formarse así la metahemoglobina que se combina con el cianuro de potasio para formar cianometahemoglobina. (4,15,28).

Técnica.

1.- Colocar exactamente 5 ml. de solución de Drabkin en tubos de 13 x 100 mm. de acuerdo a la cantidad de muestras para analizar, utilizando una perilla de succión.

2.- Trasladar exactamente 0.02 ml. de la muestra a analizar con una pipeta de Sahli exactamente estandarizada a cada tubo.

3.- Mezclar la muestra con la solución dando vueltas a los tubos.

4.- Dejar en reposo durante 10 min. para permitir la formación de cianometahemoglobina.

5.- Utilizar otro tubo como blanco conteniendo únicamente la solución de Drabkin.

6.- Ajustar con el blanco el espectrofotómetro conteniendo únicamente la solución de Drabkin a 100 % de Transmisión y a 0 de Absorción a una longitud de onda de 540 nm..

7.- Efectuar las lecturas de cianometahemoglobina para cada tubo.

5.3.5 Criterios de Pureza.

Como criterios de pureza de la hemoglobina se utilizaron los siguientes:

A.- Electrofóresis.

Fundamento.- La Electrofóresis se utiliza para la separación y medición de sustancias cargadas eléctricamente, como es el caso de las fracciones de las proteínas. Estas sustancias en solución emigran en un campo eléctrico que ---

puede ser el ánodo cargado positivamente o bien el cátodo cargado negativamente. Se aplica la muestra al medio soporte (acetato de celulosa) saturado con solución amortiguadora y se hace pasar la corriente eléctrica. La solución -- Amortiguadora permite el paso de la corriente que causa la separación de las -- moléculas según su densidad de carga neta. Se interrumpe la corriente a la -- celda electroforética, se extrae el medio soporte, se introduce en una solución fija y tñe las diversas fracciones. El análisis cuantitativo de las fraccio-- nes se hace por medio de un densitómetro que mide la intensidad de la luz re-- flejada por la fracción teñida o la cantidad de luz transmitida. Las áreas ba-- jo los picos, en cada una de las bandas obtenidas, son proporcionales a las -- concentraciones de las fracciones. (4.9).

Técnica.

1.- Preparar la muestra. Transferir una pequeña gota de la muestra en una -- pequeña tira de papel parafilm. se coloca en una superficie plana cerca de la -- celda. Se deja espacio entre una y otra tira suficiente para accionar el apli-- cador.

2.- Llenar la celda. La celda se coloca frente a la fuente de poder con los -- electrodos terminales de frente. Primero se llena la celda con solución amor-- tiguadora pH = 8.6; el sifón se coloca en posición horizontal de manera que no -- queden burbujas de aire, después la celda hasta que el líquido quede entre los -- dos líneas paralelas o al nivel del líquido.

3.- Llenar los recipientes de polipropileno. En primer lugar en el recipien-- te número uno se colocan 50 ml. de solución amortiguadora pH = 8.6 y se tapa. -- En el segundo recipiente se colocan 100 ml. de solución colorante fijadora. En -- el tercer recipiente se colocan 50 ml. de ácido acético al 5 % y se tapa. En el -- cuarto recipiente se colocan 50 ml. de alcohol absoluto y se tapa. En el quinto -- recipiente se colocan 100 ml. de solución clarificante y se tapa.

4.- Instalar la membrana de la celda. En el primer recipiente con solución -- amortiguadora pH = 8.6 se coloca la membrana. ésta se toma por un extremo con -- las pinzas, se coloca de tal manera, que quede flotando en la superficie de la --

solución amortiguadora por unos segundos, una vez impregnada se sumerge en la solución. Con las pinzas se saca la membrana de la solución amortiguadora, se coloca entre dos papeles secantes, se pasa la palma de la mano sobre el papel secante varias veces para secar el exceso de la solución amortiguadora, esta operación se efectúa rápidamente. Se toma la membrana con las pinzas, se coloca en el puente abriendo los extremos de éste, se hacen coincidir los hoyos de la membrana con los salientes del puente, se afloja el extremo móvil y ya colocada la membrana, se regresa a su lugar para que quede estirada, se cierran los extremos del puente, se quita la cubierta de la celda se coloca sobre la celda el puente con la membrana, de tal modo que los extremos de la membrana quedan sumergidos en la solución amortiguadora, se coloca la cubierta y se tapa, se cierra, se conectan los cuatro electrodos terminales con la fuente de poder.

5.- Aplicar las muestras. La gota de la muestra problema se coloca en un cuadrado de papel parafilm, sobre ella el aplicador y se presiona en el botón blanco, así en los filamentos se impregnan perfectamente; se presiona el botón rojo del aplicador, con lo que los filamentos se levantan, inmediatamente se quita la tapa de la celda, se coloca el aplicador en el número uno: debe coincidir la punta del aplicador con la concavidad en la cubierta de la celda: sucesivamente se coloca la muestra dos en el número dos, la tres en el número tres. se presiona el botón blanco, caen los filamentos cargados con la muestra problema sobre la superficie de la membrana, se esperan 10 seg. la membrana absorbe toda la muestra, se presiona el botón rojo para levantar los filamentos, inmediatamente se lavan con una piseta, la cual no debe tocar los filamentos porque son muy maleables y pueden deformarse, se secan con una absorbente tocándolos levemente.

6.- Conectar la celda a la fuente de poder para un voltaje determinado. Poner el selector de voltaje constante en la marca de 0-300:

a.- Poner el voltímetro en la marca de 0-500 V (volts).

b.- Girar a la derecha el control interruptor de ajuste de salida, prender el botón que indica el paso de corriente.

- c.- Cuando la fuente de poder se calienta, la aguja de la escala se mueve bruscamente de derecha a izquierda, se continúa a la derecha el control del interruptor del ajuste de salida hasta que la aguja está en el centro de la escala. (lectura de 250 V).
- d.- El voltímetro marca 0-15 mA, lo que indica que pasa la corriente correctamente.
- e.- Medir 20 minutos con un cronómetro.
- f.- Revisar a los 20 minutos si el desplazamiento es normal, se vuelve a colocar el indicador del voltímetro en la marca de 0-15 mA; la aguja de la escala debe dar una lectura de 4.5 a 9.5 mA.
- g.- Girar hacia el lado izquierdo el control de ajuste de salida hasta que se apague.
- h.- Desconectar los electrodos terminales de la celda de la fuente de poder.
- i.- Quitar la tapa de la cubierta de la celda.
- j.- Sacar el puente que contiene la membrana, sin tocarla con los dedos.
- k.- Quitar la membrana con las pinzas y colocar en el recipiente que contiene la solución colorante fijadora, sumergir durante 10 min.
- l.- Sacar la membrana pasando ese tiempo, escurrir y colocar en el recipiente que contiene ácido acético al 5 %, agitar la membrana en la solución para quitar el exceso de colorante y lavar con nueva solución cuantas veces sea necesario, hasta que la solución esté completamente clara.
- m.- Sacar la membrana de este recipiente, transferir al siguiente que contiene alcohol absoluto, poner a funcionar el cronómetro, agitar constantemente durante 1 minuto exacto.
- n.- Pasar al siguiente recipiente que contiene solución clarificante, agitar hasta completar un minuto exacto, este recipiente tiene en su parte baja un plato de vidrio rectangular, la membrana queda sobre él, sacar el plato con la membrana usando las pinzas, pasar al escurridor varias veces sobre la membrana.

o.- Colocar el plato de vidrio con la membrana en el horno durante 10 ó 15 minutos, entre 100 y 110°C.

p.- Sacar del horno el plato de vidrio con la membrana, dejar enfriar, desprender la membrana ya seca y transparente del plato de vidrio. Separar con una navaja un extremo de ella, jalar cuidadosamente, no tocar las bandas de separación de las protefnas.

q.- Colocar la membrana en un sobre de plástico, las bandas de separación quedan en el centro, cortar los extremos de la membrana que sobresalen del sobre plástico, queda lista para graficarse y cuantificarse.

B.- Determinación del peso molecular medio a través de la Columna de Cromatografía.

Fundamento.- Se denomina filtración en gel a la técnica de separación de moléculas de diferente tamaño mediante su paso a través de una columna de gel. -- Los polisacáridos conocidos con el nombre de dextranes se unen cuidadosamente por enlaces cruzados de manera que constituyan pequeños globulos hidrofílicos de naturaleza insoluble que cuando se colocan en agua se hinchan de manera considerable para formar un gel insoluble. Sephadex es el nombre comercial de estos geles. El fundamento de este método de separación es la propiedad que tiene el Sephadex de excluir los solutos de peso molecular grande, mientras que es accesible, para la difusión de moléculas de pequeña dimensión

Técnica.

Para determinar pesos moleculares se selecciona el gel adecuado, en este caso fué Sephadex G-100 y G-200. (2,3,6,14,23,26,29).

1.- Preparar cuidadosamente la columna y determinar los volúmenes de exclusión de algunas protefnas puras y de peso molecular conocido para establecer una curva de calibración.

2 - Colocar la protefna cuyo peso molecular se va a determinar en la misma columna y determinar su volumen de exclusión en condiciones idénticas a las em-

pleadas en las proteínas conocidas.

3.- Determinar su absorvancia a la longitud de onda en la cual absorva la - protefna que se recolectó de la columna y corroborar su pureza.

C.- Espectro de Absorción para la Hemoglobina Oxidada y para la Hemoglobina- Reducida con Bisulfito de Sodio en la Región Visible.

Fundamento.- La técnica de espectrofotometría es de gran importancia para - la Investigación bioquímica ya que con frecuencia los compuestos se identifi-- can por la determinación de sus características en base a su espectro de ab--- sorvancia en las regiones de ultra violeta ó en el rago del visible.

Técnica.- Determinar la absorción de la Hemoglobina Pura tanto en su forma- reducida como en su forma oxidada.

1.- Colocar en la celda de un espectrofotómetro como blanco 5 ml. de Solu-- ción de Reactivo de Drabkin.

2.- Ajustar en el blanco a 100 % de Transmisión y a 0 de Absorción en una - longitud de onda de 540 nm. (región visible).

3.- Colocar en una celda la hemoglobina reducida y bajar la longitud de on- da a 510 nm.

4.- Encender el graficador y correr el espectro de absorción hasta una lon- gitud de onda de 650 nm

5.- Colocar en otra celda la Hemoglobina Oxidada y volver a disminuir la -- longitud de onda a 510 nm.

6.- Encender el graficador y subir la plumilla y cambiar la tinta.

7.- Correr el espectro de absorción hasta 650 nm.

8.- Corroborar visualmente la pureza de la hemoglobina.

5.3.6. Ajuste del patrón de Hemoglobina.

1.- Ajustar la hemoglobina de la siguiente forma: tomar un volumen de Hemo- globina pura y diluir un reactivo de Drabkin hasta alcanzar una concentración- final de 15 g./ 100 ml. de sangre, equivalente a 0.42 nm. de Absorvancia a una

longitud de onda de 540 nm

2.- Efectuar la verificación de la concentración de proteína por el Método de Biuret y comparar con un patrón de concentración conocida.

5.3.7 Acondicionamiento y Estudios de Estabilidad.

Técnica de Acondicionamiento.

1.- Colocar con la ayuda de una jeringa estéril 5 ml. del patrón de Hemoglobina en frascos de 8 ml. color ámbar.

2.- Tapar y sellar los frascos herméticamente. (engargolado).

3.- Colocar los frascos a 4 diferentes temperaturas y efectuar los Estudios de Estabilidad.

Estudios de Estabilidad Acelerada.

Generalmente los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por aumento de la temperatura. Fundamentando el método en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores a lo normal, para luego sacar inferencias de lo que sucedería a la temperatura ambiente.

Técnica.

1.- Obtener los Datos.

a). Someter el producto terminado a 4 diferentes temperaturas teniendo como diferencia mínima de 10 grados entre cada temperatura.

b). Efectuar tiempos de análisis.

b.1 Análisis Inicial

b.2 Análisis Semanal (por tres meses).

c). Determinar parámetros para cada análisis.

c.1 Estabilidad Química: Determinar el porcentaje de proteína activa.

c.2 Estabilidad Física.

2.- Ordenamiento de Datos. Agrupar los datos en una tabla de Concentración con respecto al tiempo.

3.- Determinar el orden de reacción a la temperatura más alta por método gráfico. Graficar los datos en las tres siguientes formas: en la primera el porcentaje de la concentración con respecto al tiempo, en la segunda el logaritmo natural de la concentración contra el tiempo, en la tercera el inverso de la concentración contra el tiempo.

3.1 Obtener la ecuación de la recta para cada gráfica y ajustar por mínimos cuadrados.

3.2 Determinar para cada recta el valor del coeficiente de correlación más cercano a 1.

4.- Determinar el orden de reacción en base al valor del coeficiente de determinación más cercano a 1.

5.- Obtener las constantes de velocidad " k " para las cuatro temperaturas graficando de acuerdo al orden de reacción la concentración contra el tiempo. El valor de la pendiente de cada línea corresponde al valor de " k ".

6.- Obtener las constantes de la ecuación Arrhenius. Determinar gráficamente por el método de mínimos cuadrados la ordenada al origen (A) y el valor de la pendiente de los cuales se determina la energía de activación en base al valor de la constante de los gases.

7.- Determinar el valor de " k " a 25°C en la ecuación de Arrhenius.

8.- Determinar por medio del valor de " k " a 25°C los valores de tiempo al 95 % y tiempo al 50 %.

9.- Concluir la estabilidad del producto así como su fecha de caducidad.

6. RESULTADOS.

6.1 Calibración de la columna.

Proteína	Peso Molecular	Fracción
Citocromo C	13 370	41
Albúmina Humana	68 500	31
Albúmina de Huevo	43 000	34

6.2 La hemoglobina se detectó en la fracción número 32 (ver gráfica # 1).

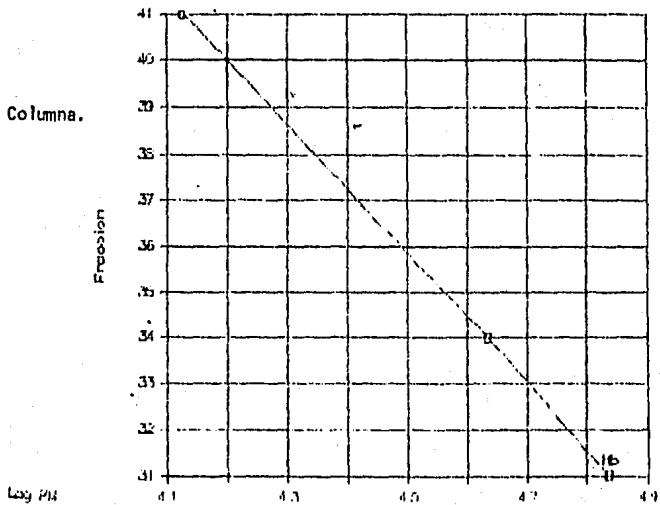
Modelo:

$$F = 98.9419 - 14.0362 \log.$$

$$r = -0.9999$$

$$r^2 = 0.9997$$

Gráfica # 1
Calibración de la Columna.



6.3 Comparación de los métodos de cuantificación por Biuret (proteínas -- totales) y por Cianometahemoglobina obteniendo una " t " apareada.

Lote	Método de Biuret		Método de Drabkin		" t "
1	1.785	1.821	1.920	1.877	0.64
	1.875	1.821	1.821	1.928	
	1.785	1.857	1.857	1.785	
	1.857	1.872	1.857	1.850	
	1.892	1.785	1.821	1.785	
2	2.929	2.928	2.920	3.000	0.04
	2.857	2.821	2.875	2.850	
	2.857	2.892	2.850	2.920	
	2.821	2.857	2.780	2.920	
	2.857	2.890	2.850	2.850	
3	3.214	3.250	3.214	3.214	-0.63
	3.178	3.250	3.142	3.214	
	3.214	3.214	3.285	3.214	
	3.178	3.214	3.285	3.214	

6.4 Criterios de Pureza.

a.- Electroforesis. Hemoglobina perfectamente pura.

b.- Determinación de la pureza de la hemoglobina por su peso molecular.

Fué determinado el peso molecular partiendo de la calibración de la columna- como se demuestra anteriormente en el punto 6.1.

c.- Determinación de la pureza de la hemoglobina por Espectrofotometría.

Se efectuó un barrido espectrofotométrico desde la longitud de onda de 510 nm. hasta los 650 nm. tanto de la hemoglobina en su forma reducida como en su forma oxidada. (observar gráfica # 2).

GRAFICA # 2.

BARRIDO ESPECTROFOTOMETRICO DE HEMOGLOBINA REDUCIDA Y HEMOGLOBINA OXIDADA.

Rango de Absorción: 510 nm a 650 nm.

Rango de lectura: 0 a 2 de extinción.

Velocidad de la carta: 20 nm/ cm.

Hemoglobina Oxidada: Máximos a 540 nm y 575 nm.

Hemoglobina Reducida: Máximo a 540 nm.

Nota: A continuación se ilustran los resultados de estabilidad obtenidos a diferentes temperaturas.

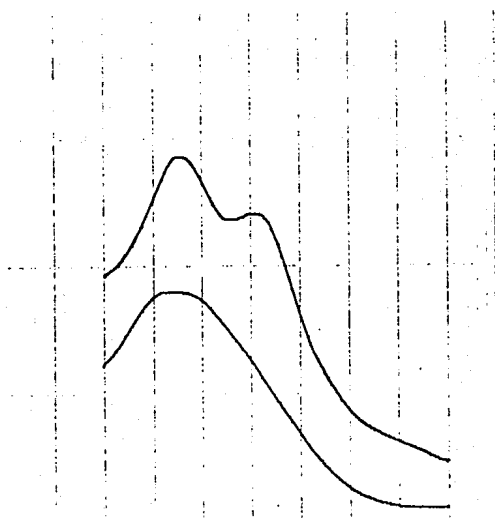


Tabla # 1. RESULTADOS DE CONCENTRACION Y TIEMPO.

TEMPERATURAS	TIEMPO (SEMANAS).											
	CONCENTRACION (ABSORCION EN NM.)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6°C = 286°K	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
24°C = 297°K	0.41	0.32	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.29	0.29	0.28	0.28
37°C = 310°K	0.37	0.32	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.27	0.25	0.25	0.23	0.23
47°C = 320°K	0.37	0.30	0.28	0.24	0.24	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.21	0.18

Tabla # 2. RESULTADOS DE CONCENTRACION Y TIEMPO.

TEMPERATURAS	TIEMPO (SEMANAS).												CONCENTRACION (ABSORCION EN NR.)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
6°C = 286°K	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
24°C = 297°K	97.61	76.19	73.80	71.43	71.43	71.43	71.43	71.43	69.05	69.05	66.66	66.66	
37°C = 310°K	88.10	76.19	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67	64.29	59.32	59.32	54.76	54.76	
47°C = 320°K	88.10	72.62	66.67	57.14	57.14	54.76	54.76	54.76	52.38	52.38	50.00	42.85	

Tabla # 3. LOGARITMO NATURAL DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO.

TEMPERATURAS	LOGARITMO NATURAL DE LA CONCENTRACION												TIEMPO (SEMANAS).
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
6°C = 286°K	4.6051	4.6051	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	4.605	
24°C = 297°K	4.580	4.3332	4.301	4.268	4.268	4.268	4.268	4.268	4.234	4.234	4.199	4.199	
37°C = 310°K	4.478	4.333	4.199	4.199	4.199	4.199	4.199	4.163	4.082	4.082	4.002	4.002	
47°C = 320°K	4.478	4.285	4.199	4.045	4.045	4.003	4.003	4.003	3.958	3.958	3.912	3.575	

Tabla # 4. INVERSO DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO.

TEMPERATURAS	INVERSO DE LA CONCENTRACION TIEMPO (SEMANAS).											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6°C = 286°K	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
24°C = 297°K	0.010	0.013	0.0135	0.0139	0.0139	0.0139	0.0139	0.0139	0.0144	0.0144	0.015	0.015
37°C = 310°K	0.0113	0.0113	0.0149	0.0149	0.0149	0.0149	0.0149	0.0155	0.0168	0.0168	0.0182	0.0182
47°C = 320°K	0.0114	0.0138	0.015	0.0175	0.0175	0.0183	0.0183	0.0183	0.0191	0.0191	0.02	0.023

6.5 Estudios de Estabilidad Acelerada.

En base a las tablas anteriores se determinó gráficamente el orden de reacción a la temperatura mas alta, se obtiene la ecuación de la recta y se determina el coeficiente de determinación r^2 con lo que se deduce el orden de reacción. Para 24°C (gráfica # 3).

ORDEN	COEFICIENTE DE DETERMINACION.
0	0.94478307
1	0.9924444
2	0.999840

De acuerdo a los valores obtenidos para el orden de reacción se determina - la reacción de segundo orden para la Hemoglobina como producto terminado.

Obtención de las constantes de velocidad (" k ") para las cuatro diferentes temperaturas (ver gráfica # 4).

TEMPERATURA	VALOR DE " k "	ln de " k "	VALOR DE " b "
286°K	0	-	-
297°K	0.00275	-5.8961	0.01202
310°K	0.00051	-7.5810	0.01204
320°K	0.0007	-7.2644	0.0125

Obtención de las constantes de Arrhenius. (Gráfica de ln K entre inverso de la Temperatura).

Forma lineal de la Ecuación de Arrhenius.

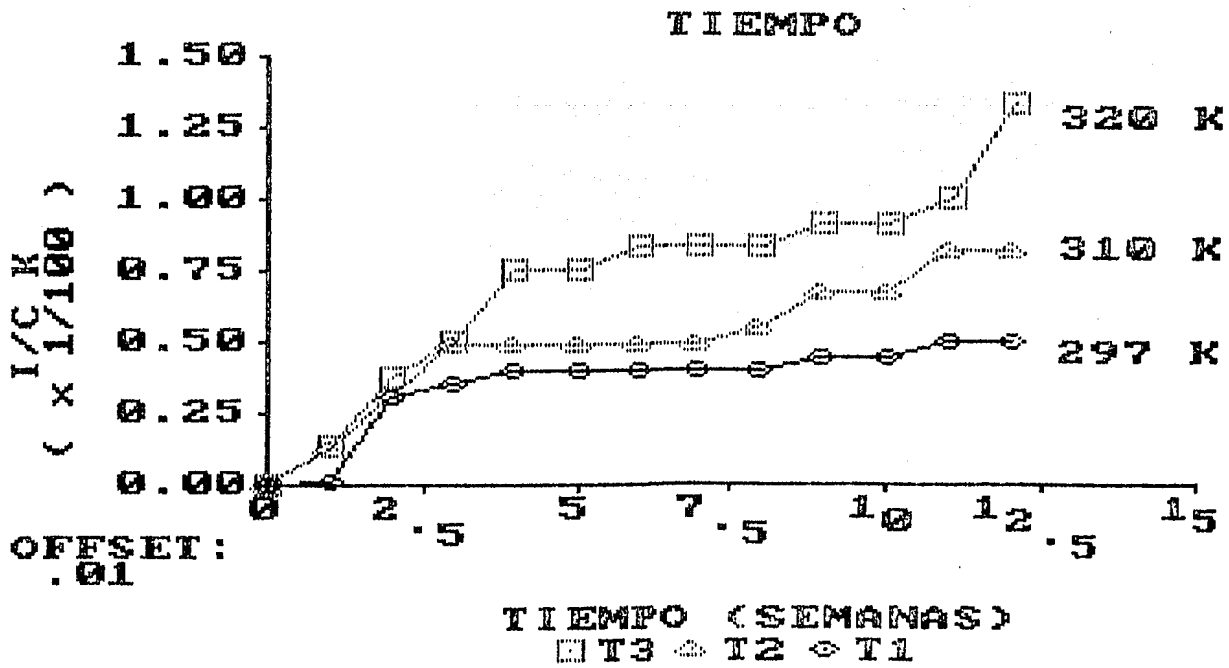
$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R T}$$

Obtención de los valores de la Ecuación Lineal a 25°C.

GRAFICA # 3.

GRAFICA DE INVERSO DE LA CONCENTRACION CONTRA EL TIEMPO PARA OBTENCION DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD (" K ") A LAS CUATRO DIFERENTES TEMPERATURAS.

45

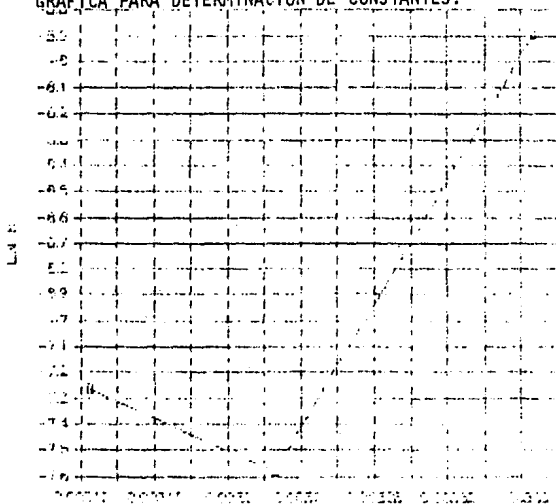


Obtención de los valores de la Ecuación Lineal.

ORDEN	$\ln A$	E_a / R	E_a (kcal / mol)
0	3.895574	1435.212	2851.7668
1	2.79291	2394.4373	4757.74
2	1.951253	3483.019	5920.7588

GRAFICA # 4

GRAFICA PARA DETERMINACION DE CONSTANTES.



Determinación de "K" a 25°C (k=25) en la Ecuación de Arrhenius.

$$K_{25} = 5.89 \times 10^{-5}$$

Determinación del valor de t_{95} y de t_{50} .

Valor de $t_{95} = 18.69$ días

Valor de $t_{50} = 170$ días

7. DISCUSION DE RESULTADOS.

7.1 Calibración de la Columna. Como se observa en los resultados de la -- columna se calibró con tres proteínas de concentración conocida y de peso molecular bien determinado; al calibrar la columna es de suma importancia la verificación de el volumen de exclusión de la columna. Una vez calibrada se determinó la fracción de la cual aparece la Hemoglobina determinando su peso molecular lo que es de suma importancia como criterio de pureza.

7.2 La comparación de los métodos de cuantificación (método de Biuret y método de cianomtahemoglobina) se encuentra equivalente ya que la pureza de la Hemoglobina es muy importante porque al determinar la " t " de Student de acuerdo a los datos se observa que los dos métodos son equivalentes con un 95% de confianza.

7.3 La determinación de hemoglobina se cuantificó como ya se explicó anteriormente por tres métodos, el de peso molecular en base al gel utilizado -- que es determinante para pesos moleculares dentro de los cuales se encuentra la hemoglobina, el segundo método es el espectrofotométrico y se observó tanto la pureza de la hemoglobina en su forma oxidada como en la forma reducida esto es posible verificarlo al observar las gráficas de absorción del rango de longitud de onda de 510 a 650 nm. Otro Criterio de pureza utilizada fué la electrofóresis para corroborar la pureza de la Hemoglobina .

7.4 En cuanto a los Estudios de Estabilidad Acelerada pudo determinarse una posible fecha de caducidad de 18.69 días a temperatura ambiental, encontrándose un tiempo al 50 % de 170 días. Se propone un estudio de Estabilidad de varios lotes para determinar perfectamente una fecha posible de vencimiento a otras temperaturas. En este caso se observa que no hay ninguna degradación de la proteína en el transcurso de tres meses a temperatura de refrigeración que es una de las indicaciones de almacenaje del producto.

8. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos y discutidos anteriormente se puede -- concluir que el protón de Hemoglobina obtenido dentro de la ENEP Zaragoza se en-- cuenta dentro de las condiciones óptimas de fabricación, acondicionamiento y re-- gido dentro de normas aceptables de Control de Calidad para su uso dentro de las-- Clínicas Multidisciplinarias. Es de tomarse en cuenta el resultado del Estudio de-- Estabilidad Acelerada ya que nos proporciona una probable fecha de vencimiento -- del producto. Se propone la fabricación de varios lotes como objetivo de estudio-- para determinar mayores parámetros en cuanto a los Estudios de Estabilidad y as-- especificar con mayor exactitud una posible fecha de vencimiento.

9. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bhagavan H. V.: "Bioquímica". Nueva Editorial Interamericana. S. A. 1a. edición en español. México 1978 pp. 467-533.
- 2.- Berman M. C., Kench J. E.: Separation of Myoglobin and Hemoglobin on a column of dextran gel. J. Clin. Pathol. 16 (1963) 385.
- 3.- Bill A., Mersen N., Ulfendahl H. R.: Some applications of a new gel - filtration method for molecular separation. Scand. J. Invest. 12 (1960) 392-395.
- 4.- Davidson I., Henry J. E.: " Diagnóstico Clínico por el Laboratorio ". Ed. Salvat. 6a. edición. pp. 107-118.
- 5.- Drabkin D.: The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of human. J. Biol. Chem. 164-703 (1946).
- 6.- Franzini C.: Gel filtration applied to some clinical problems. J Chromat. 28 (1967) 37-43.
- 7.- Ferreras V., Rozman C.: " Medicina Interna Tomo 11 ". Editorial Marín - Novena edición. 1978.
- 8.- Ferry R., Green A.: Studies in the Chemistry of Hemoglobin. (1928).
- 9.- Ganong W.: " Fisiología Médica ". Editorial El Manual Moderno. Novena-edición. pp. 534-555. 1984.
- 10.- Giardine W.: Purification and Functional Properties of the Hemoglobin-Component from the rats. (Wistar) Eur. J. Biochem. 116, 2 (1981).
- 11.- Haurowitz F., Hoppes S. Z.: Hemoglobin. 254-266 (1938).
- 12.- Heidelberg M. A.: Method for the preparation of crystalline oxyhemoglobin. J. Biol. Chem. 53,31 (1922).
- 13.- Hunter F. Hunter A.: Design of Experiments. 1a. ed. John Willy and Sons. Nueva York 1983.
- 14.- Leiko W., Gondko R.: Separation of hemoglobin and cytochrome C by electrophoresis and by chromatography on DEAD-Sephadex. Biochem. Biophys. Acta -

77 (1963) 500-501.

15.- " Manual de Técnicas y Procedimientos ". Merck. México 1982.

16.- Méndez L.: " El protocolo de Investigación ". UNAM. 1980.

17.- Norma H.: " SSPSS ". McGraw Gill. USA 1983.

18.- Parrao J., Velez O.: "Hematología". 1a. edición. Instituto Mexicano de Hematología. México 1982.

19.- Pavla D., Lampan G., Kriz G.: Introduction to Organic Laboratory Techniques. Ed. Saunders. 1976.

20.- Perutz M. F.: Structure of Haemoglobin. Nature 199, 633-638. (1938).

21.- Perutz M. F.: Three dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhaemoglobin at 2.8 A Resolution; the atomic model. Nature 219, 131-139. (1968).

22.- Platt W. R.: Color Atlas and Textbook of Hematology. J. B. Lippincott -- Company. Philadelphia, Toronto 1969.

23.- Plumer D.: " Introducción a la Bioquímica Práctica ". 1a. edición McGraw-Gill. México 1982.

24.- Petrides O.: Reverse phase high performance liquid chromatography of the proteins, the separation of hemoglobin chain variants. Clin. Chem. 18-1041 -- (1983).

25.- Raph C., Tsay Jia-Yeong.: Statistics in the Pharmaceutical Industry. Marcel Dekker., Inc. 1981.

26.- Ratcliff A. P., Hardwicke J.: Estimation of Serum haemoglobin-binding --- capacity (haptoglobin) on Sephadex G-100. J. Clin. Pathol. 17 (1964) 676-- 679.

27.- Sbarbatl N. E.: " Estabilidad de Medicamentos ". Editorial Ateneo. 1975.

28.- Schoeder W. A., Huisman T. H., Shelton J. R.: An improved method for --- quantitative determination of human fetal hemoglobin. Anal. Biochem. 35 (1970) 235-243.

29.- Schoeder W.A.: High performance liquid chromatography in the identifica-- tion of human hemoglobin. Prog. Clin. Biol. Res. 5, 2 (1981).

- 30.- Stransky Z., Srch M.: Separation of myoglobin and haemoglobin on Sephadex thin layers. J. Chromatogr. 28 (1967) 146-147.
- 31.- Spiegel M. R.: " Estadística ". 1a. Edición, McGraw Gill, 1983.

APENDICE.

PREPARACION DE REACTIVOS.

Solución Amortiguadora de Fosfatos pH = 7.2.

1.- Preparación de fosfato de sodio monobásico 0.2 M.

Disolver 27.22 g. de fosfato de sodio monobásico (KH_2PO_4) en agua y aforar con agua a 1000 ml.

2.- Preparación de la solución amortiguadora pH = 7.2.

Tomar 50 ml. de la solución de fosfato de sodio monobásico y transferir a un -
matríz volumétrico de 200 ml., añadir 34.7 ml. de solución de hidróxido de sodio
0.2 M, añadir agua para completar a volumen

Solución Salina Isotónica.

Pesar 0.9 g. de cloruro de sodio, diluir y aforar a 100 ml. con agua.