

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

COMPARACION DEL METODO DE BIURET Y
ENLACE A COLORANTE PARA DETERMINAR
ALBUMINA SERICA

T E S I S P R O F E S I O N A L
Q U E P A R A O B T E N E R
E L T I T U L O D E :
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O
P R E S E N T A
B E R N A R D O S C H M I D T Y N E D V E D O V I C H

320

1 9 7 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AS. Tesis
ADQ _____
FECHA 1975
PROC H 3/210 318
S. _____



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE GUADALUPE VELAZ PRATT

V O C A L RAMON GUEVARA ESTRADA

SECRETARIO DEA CORONADO PERDOMO

Sitio donde se desarrolló el tema:

C. DE SALUD "DR. MANUEL CARDENAS DE LA VEGA"

Nombre y Firma del sustentante:

BERNARDO SCHNIDT Y NEDEVDOVICH

Nombre del asesor del tema:

DEA CORONADO PERDOMO

A MIS PADRES CON TODO CARIÑO Y
EN RECONOCIMIENTO DE SU APOYO.

A MIS HERMANOS CON
CARIÑO Y SINCERIDAD

A LA Q.F.B. DEA CORONADO POR SU GRAN AYUDA EN LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A MIS AMIGOS

I N D I C E

<u>INTRODUCCION</u>	i
<u>GENERALIDADES</u>	1
Origen de las Proteínas.....	9
Funciones.....	11
Alteraciones.....	14
Métodos para la Separación.....	16
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	19
Método de Kingsley-Reinhold.....	21
Método de Rodkey.....	28
<u>RESULTADOS</u>	36
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	42
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	45

introducción

INTRODUCCION

El análisis cuantitativo de los componentes proteicos del suero, tales como albúmina, globulinas, fibrinógeno, ha sido por muchos años un procedimiento de gran ayuda en el diagnóstico clínico de diversas enfermedades.

Se han desarrollado infinidad de métodos para la determinación de los componentes proteicos del suero; usando el fraccionamiento salino y que aprovechan la reacción de biuret, fue Kingsley el primero en idear un método rápido que más tarde modificó Reinhold (7), para hacerlo más sencillo y ser utilizado en las prácticas de rutina, le precedió Kjendahl. Métodos físicos basados en la viscosidad plasmática, tensión superficial, pero muy poco precisos y exactos. Los turbidimétricos muy simples pero muy poco específicos, hasta los métodos más sofisticados, como: el de Folin-Ciocalteu, que utiliza varios tipos de fenoles y alícuotas muy pequeñas de suero; la electroforesis, con extraordinarios resultados, pero que no se encuentra al alcance de cualquier laboratorio por el alto costo del equipo.

Por último, los métodos que son producto de las más recientes investigaciones, todos tendiendo a la simplificación, para obtener valores más exactos y disminución de las manipulaciones, como son, específicamente para la cuantificación de la albúmina el de Anaranja do de Metilo ideado por Bracken y Klotz modificado por Keyser (1); el de HABA, o sea utilizando el 2(4'-Hidroxi azobenceno) ácido benzóico, ideado por Rutstein (12), y el de Verde de Bromocresol desarrollado por Rodkey (9), quien ha descubierto una afinidad muy especial de la albúmina por este colorante.

Es la intención de este trabajo el comparar el método clásico de Kingsley modificado por Reinhold (7), que utiliza la reacción de biuret, con el método de enlace a colorante del Verde de Bromocresol, que utiliza Rodkey, asimismo el determinar la estabilidad de la reacción y proporcionar un dato estadístico sobre la confiabilidad del método.

generalidades

GENERALIDADES

La palabra proteína deriva del griego "Proteios" que significa "que tiene el primer lugar". Este es el mejor resumen del extraordinario papel que juegan las proteínas en las células vivas y refuerza el acierto de esta denominación sugerida por Berzelius en 1838(2).

Formalmente son polímeros de aminoácidos. El tamaño mínimo con el cual un polipéptido puede ser llamado proteína, se considera usualmente que va desde un peso molecular de 5000 hasta varios millones por ejemplo: Hemoglobina, globulina, etc.

Están constituidas por una o varias cadenas de péptidos que contienen 20 diferentes aminoácidos esenciales y depende del orden de sucesión en el cual aparecen en las proteínas para que determine sus propiedades y su forma.

El orden de sucesión de los aminoácidos en estas moléculas está fijado por la información genética de la célula, además tienen la necesaria diversidad de estructura para construir las diferentes proteínas, pero, aun así, no proporcionan por ellos mismos todas las clases de grupos químicos necesarios para cada función biológica que cumplen las proteínas. Estos grupos se asociarán fuertemente con otros compuestos que tengan la estructura deseada, el resultado de la asociación es una proteína formada de cadenas de péptidos, la apoproteína y en algunas ocasiones asociada a un compuesto no peptídico, el grupo prostético (de prótesis=parte adicional).

A pesar de tanta complejidad se ha logrado determinar la secuencia de los aminoácidos de varias proteínas.

Sanger (2), bioquímico inglés, obtuvo el premio nobel de Química por haber precisado el orden de sucesión de los aminoácidos de la insulina, sus métodos de hidrólisis controlada de proteínas para obtener péptidos reconocibles han sido empleados por otros investigadores para encontrar la secuencia de los aminoácidos en la ribonucleasa y en la hormona adenocorticotrófica (ACTH).

Las proteínas por su estructura se dividen en fibrosas y globulares. (Fig. No. 1)



Fig. No. 1 Representación esquemática de las proteínas fibrosas (A) y globulares (B).

Como su nombre lo indica, las proteínas fibrosas están formadas por cadenas filamentosas unidas lateralmente por diferentes tipos de enlaces para formar una estructura estable e insoluble. Ejemplo: Queratina, Miosina y Colágena.

Las proteínas globulares son de configuración más o menos esférica, que depende del plegamiento compacto de las cadenas peptídicas sobre sí mismas.

Linus Pauling del Instituto Tecnológico de California (2), recibió el premio Nobel en Química por su estudio sobre la naturaleza de las relaciones químicas de macromoléculas, especialmente de las proteínas.

Los estudios de Rayos X sobre proteínas y polipéptidos sintéticos llevaron a Pauling a proponer una estructura que presenta la máxima estabilidad teórica, a la cual denominó como alfa hélice y está compuesta por una cadena de unidades de aminoácidos en forma de espiral, estructura que se mantiene mediante puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y los grupos imido de cada tercer residuo peptídico a lo largo de la cadena. La hélice contiene 3.6 de aminoácidos por cada vuelta completa de espiral. (Fig. No. 2).

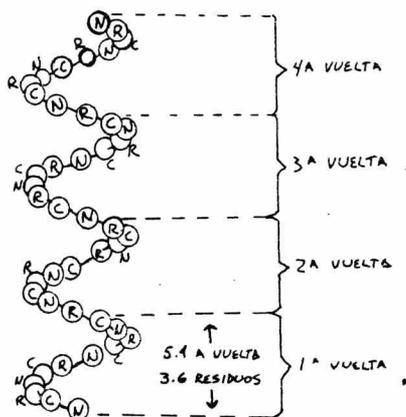


Fig. No. 2. Representación de una cadena polipeptídica en forma helicoidal.

recen en una ordenación regular a lo largo de la cadena. (Fig. No. 4)

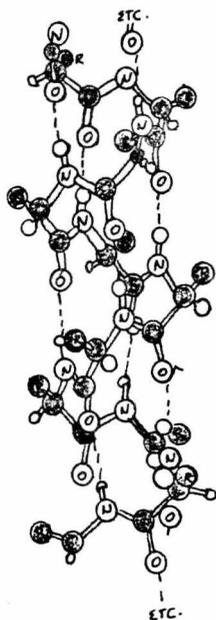


Fig. No. 4. Estabilización de una configuración alfa helicoidal por puentes de hidrógeno para producir una estructura secundaria. Todas las bolitas oscuras representan átomos de carbono o residuos (R) de los aminoácidos.

- c) ESTRUCTURA TERCIARIA.— Con objeto de comprimir la larga cadena espiral en forma globular, se efectúan grandes enrollamientos o dobleces para dar una estructura rígida compleja. La estabilización de esta estructura se debe también a diferentes reactividades de los grupos (R) de los residuos de los aminoácidos. (Fig. No. 5).

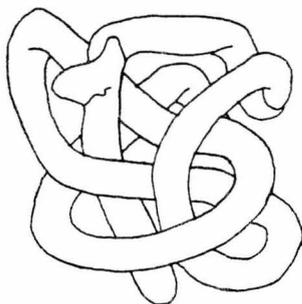


Fig. No. 5 Esquema que ilustra los repliegues complicados de una proteína globular estabilizada por enlaces no covalentes.

- d) ESTRUCTURA CUATERNARIA.— Define el grado de polimerización de una unidad proteica. Por ejemplo, la fosforilasa contiene subunidades idénticas, las cuales solas son inactivas, pero unidas en forma de tetramero producen la enzima activa. Este tipo de estructura se denomina cuaternaria homogénea; si existen unidades diferentes como en el virus del mosaico del tabaco con unidades complejas de ácido ribonucleico y proteína las cuales constituyen el virus activo, este es el caso de una estructura cuaternaria heterogénea. Habitualmente las enzimas reguladoras tienen es-

estructura cuaternaria.

Las proteínas sanguíneas constituyen la mayor parte de los sólidos del plasma, siendo éstas:

HEMOGLOBINA.- Es la proteína respiratoria de todos los vertebrados; se localiza exclusivamente en los eritrocitos, y es la que se encuentra en mayor concentración. Por ser fácil de purificar se ha logrado abundante información con respecto a su estructura y mecanismo de acción. Es una proteína del grupo de las globulinas de un peso molecular de 65,000, conjuga cuatro grupos hem, como grupo prostético con cuatro cadenas de globulinas.

ALBUMINA.- Constituyen el 50% de las proteínas plasmáticas totales y juega un papel relativamente pasivo. Sirve para mantener la presión osmótica de la sangre y tienen extraordinaria capacidad amortiguadora del pH. La Seroalbúmina tiene un peso molecular aproximado de 67,000 y es globular típica.

FIBRINOGENO.- Forma el 4% de las proteínas plasmáticas totales y juega un papel importante en la coagulación de la sangre.

ANTICUERPOS.- En el plasma sanguínea hay un grupo de proteínas clasificadas dentro de las gamaglobulinas que se denominan anticuerpos. Se forman dentro del organismo como respuesta a un material heterólogo llamado antígeno.

ENZIMAS.- Son proteínas que actúan como catalizadores de las diferentes reacciones bioquímicas que suceden dentro del organismo.

HORMONAS.- A pesar de que se encuentra en muy baja concentración, su acción es bastante específica en la regulación de fenómenos metabólicos.

ORIGEN DE LAS PROTEINAS

El hígado es la principal fuente de albúmina; fibrinógeno; protrombina, y la mayor parte de las globulinas alfa y beta, siendo las gamaglobulinas las únicas proteínas que se originan en las células plasmáticas y en el tejido linfático.

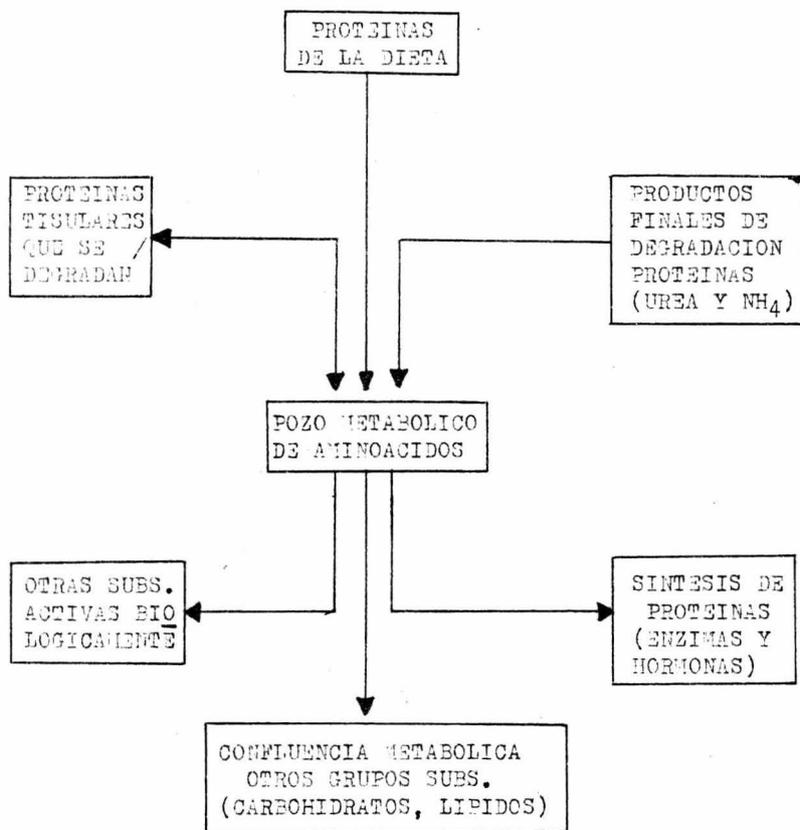
Las albúminas con peso molecular de aproximadamente 69,000; pH de 5.4; fácilmente cristalizables; su molécula es ovalada, y constituyen la proporción mayor de proteínas plasmáticas, del 60 al 62%.

Su regeneración en el hígado es continua así como su degradación que se verifica principalmente por el sistema reticuloendotelial, sin embargo, sus variaciones en el plasma obedecen esencialmente a alteraciones características ya sean del hígado o del sistema reticuloendotelial.

Las globulinas se forman esencialmente en el sistema reticuloendotelial, señalándose que posiblemente haya otras porciones tisulares que contribuyen a esta función. Como principales formadores de globulinas se menciona el intestino, bazo, pulmón, riñón y en forma importante las células plasmáticas, principalmente las de gamaglobulinas.

El fibrinógeno tiene peso molecular de 400 - 500,000, su molécula es anormalmente alargada. Se sintetiza principalmente en el hígado y en menor proporción en la médula roja de los huesos.

Las proteínas de la dieta sirven como precursores de las proteínas del plasma. Muchos experimentos han demostrado que existe una relación directa entre la cantidad y calidad de las proteínas ingeridas y la formación de las proteínas del plasma, incluyendo también la producción de anticuerpos.



FUNCIONES DE LAS PROTEINAS PLASMATICAS

Múltiples son las funciones de las proteínas plasmáticas pudiéndose clasificar en: Fisicoquímicas, Alimenticias, Defensivas y de Transporte.

FUNCIONES FISICOQUIMICAS. Una función importante de las proteínas del suero es el mantenimiento de la relación entre la presión osmótica de la sangre circulante y el líquido intersticial.

La concentración de los electrolitos y de los solutos orgánicos es sustancialmente la misma en el plasma y en el líquido intersticial por tanto, las presiones osmóticas debidas a esta sustancia son prácticamente idénticas.

Muy importante es la presión osmótica de las partículas coloidales protéicas, su presión de imbibición (por su tendencia a retener agua) y la contra presión de las mismas debidas al equilibrio, conjunto al que se ha llamado presión oncótica.

La presión oncótica, que tiene una resultante de 23 a 28 mm de Hg, de fuera hacia el interior de los capilares, está contrarrestada principalmente por la presión mecánica del corazón, así que en un capilar el predominio de la presión circulatoria de 33mm de Hg aproximadamente en la parte inicial, provoca la salida del líquido hacia el tejido que lo rodea, arrastrando consigo, hacia los espacios intersticiales, las materias nutritivas necesarias.

A lo largo del capilar la presión mecánica disminuye hasta 12-15mm de Hg, predominando entonces la presión oncótica que se mantiene constante, obligando al líquido a volver al torrente circulatorio llevando las materias de desecho del tejido.

Cada gramo por ciento de albúmina del suero ejerce una presión oncótica de 5.54mm de Hg, mientras que la misma cantidad de globulina sérica ejerce solo una presión de 1.43 mm de Hg.

La albúmina es de importancia capital en el mantenimiento de la presión oncótica del plasma. Un gramo de albúmina retiene 18ml del líquido de la corriente sanguínea.

Cuando el equilibrio de la presión oncótica y osmótica se altera, se produce retención anormal del líquido en el espacio intersticial, lo que puede suceder cuando la presión oncótica desciende por bajar el nivel proteico del plasma, a esta retención anormal del líquido intersticial se le llama edema.

Otra función fisicoquímica es el mantenimiento del pH sanguíneo y orgánico en general. Esto se debe a su comportamiento anfotérico, y más que neutralizar ácidos o álcalis, disminuyen su ionización de acuerdo con el pH en que se encuentran, por efecto de ión común, actuando en resumen como amortiguador del pH.

FUNCION ALIMENTICIA. Su papel alimenticio está en el aporte de nitrógenados a los diferentes tejidos de la economía orgánica, por su degradación continua hasta polipéptidos y aminoácidos que sirven como materia prima para la resíntesis de proteínas celulares, además los aminoácidos son parcialmente transformados por el hígado a glúcidos.

Las proteínas circulantes del plasma no son estáticas sino que están en constante recambio con una reserva lábil de los tejidos, igual en cantidad a las proteínas circulantes. A este intercambio se ha aplicado el término de equilibrio dinámico.

FUNCIONES DEFENSIVAS. Se presenta este tipo de función principalmente por el hecho de que los anticuerpos están constituidos por gammaglobulina y en estado inmune la riqueza plasmática en ésta está elevada. Además las proteínas actúan neutralizando venenos y toxinas que alcanzan la circulación.

FUNCIONES DE TRANSPORTE. Dentro de éstas tenemos el transporte, por medio de la albúmina: de ácidos grasos libres, y bilirrubina; y por otras proteínas: el de lípidos incluyendo, el de las vitaminas liposolubles; de las hormonas esteroides, anticuerpos, y posiblemente también de ciertos carbohidratos.

ALTERACIONES DE LAS PROTEINAS PLASMATICAS.

DISPROTEINEMIA. Puede presentarse como Hipo, Normo o Hiperproteíemia, siendo el desequilibrio de las fracciones proteicas siempre en el mismo sentido, es decir, descenso de las albúminas, con persistencia normal o incremento de las globulinas, lo que ha tratado de explicarse por una interdependencia genética, a pesar de que, en conjunto, se establece un origen hepático de las albúminas y reticulo-endotelial de las globulinas; Grass (14), piensa que puede haber transformación de albúmina a globulina en el propio plasma circulante, lo que desde luego no se ha demostrado.

Existe un descenso de la albúmina en padecimientos tales como: Glomerulonefritis crónica; Amiloidosis; Edema nefrítico; Quemaduras, o bien, pérdida por Hemorragias intensas; en el Hipertiroidismo; Falla cardíaca; estados de choque, y otros.

PARAPROTEINEMIA. Se denomina así a la aparición en el plasma, de una proteína que normalmente no se encuentra en él y con características fisicoquímicas distintas a las de las proteínas normales y se acompaña generalmente de disproteinemia, como: la proteína de Bence-Jones, generalmente en el plasmocitoma; a la que se haya en la amiloidosis; a las crioglobulinas, y a las macroglobulinas.

Un constituyente anormal de la fracción de globulinas alfa en el suero humano, es la llamada proteína C reactiva. Esta se forma en el organismo como respuesta a una reacción inflamatoria y se le ha dado esa denominación porque forma un precipitado con el polisacárido somático C del neumococo.

PSEUDODISPROTEINEMIA. Caracterizada por variaciones de la proteiné-
mia por hemodilución o hemoconcentración, sin perturbaciones del equi-
librio normal entre las fracciones, se puede presentar con Hipo,
Normo o Hiperproteinemia, debido a largos ayunos y/o desnutrición.

DIFERENTES METODOS PARA LA SEPARACION DE LAS PROTEINAS

La separación, frecuentemente, se lleva a cabo usando distintos solventes ó electrolitos, que de acuerdo con sus características de solubilidad, constituyen la base de los métodos que se utilizan comunmente en la determinación de las fracciones proteicas en el laboratorio clínico. Así, se acostumbra separar las proteínas del suero en dos grupos, Albúminas y Globulinas. Empleando una solución al 27% de sulfato de sodio, precipitan las globulinas y se deja a las albúminas en solución. Haciendo un análisis de nitrógeno en el filtrado obtenido, después de la separación, se determina su concentración en el suero.

A menudo se expresa la concentración de estas dos fracciones proteicas principales, indicando la relación que existe entre albúmina y globulinas como relación A/G. Cuando se lleva a cabo una separación apropiada de ambas fracciones, albúmina y globulinas, su valor normal es aproximadamente de 1.2 : 1.0. En muchos padecimientos esta relación esta alterada y en muchos otros esta invertida.

En 1921, Howe (14), introdujo un método químico para la separación de las globulinas del suero. En este procedimiento se trata 1.0 ml de suero con 30 ml de sulfato de sodio al 22.2%. Posteriormente se ha encontrado que con esta solución no se precipitan todas las globulinas, por lo que los valores obtenidos con este método son demasiado elevados para las albúminas y consecuentemente demasiado bajo para las globulinas.

En 1937, Tiselius (4), aplicó el principio de la migración de partículas cargadas electricamente en una solución electrolíti-

ca al hacer pasar una corriente eléctrica a través de la solución (electroforesis) para el análisis de las proteínas del plasma, obteniendo también patrones característicos, ahora llamados patrones electroforéticos.

Sin embargo, se sabe que algunas de las proteínas del plasma que difieren en tamaño; forma; composición, y actividad fisiológica, pueden presentar idéntica ó casi idéntica movilidad en las condiciones habituales del análisis electroforético.

En 1942, Kingsley y Reinhold (7), desarrollaron un método para fraccionar los componentes proteicos, basado en una mezcla de sulfato-sulfito compuesta de 20.8 g de sulfato de sodio anhidro y 7.0 g de sulfito de sodio anhidro, con la cual han comprobado que, a dicha concentración las globulinas se precipitan mientras que la albúmina queda en solución. Ultimamente se ha hecho una corrección a la concentración de la mezcla de sulfato-sulfito de la siguiente manera: 26.0 g de sulfato de sodio anhidro y 0.6 g de sulfito de sodio anhidro para 100 ml de solución.

Hasta la fecha esta es la técnica de fraccionamiento salino albúmina/globulina más utilizada.

En 1956, Jenck, Smith y Dumun, publicaron un artículo en el que hacen una revisión detallada del significado clínico de los análisis de las proteínas del suero por medio de la electroforesis en papel.

En 1958, Owen, también revisó este tema de una manera mas extensa proporcionando patrones electroforéticos específicos.

→ En 1964, E.J. Cohn y Cols., (2), desarrollaron métodos para fraccionar las proteínas del plasma que son particularmente útiles para el aislamiento masivo de cada uno de los componentes. El método se lleva a cabo a bajas temperaturas con soluciones salinas de baja concentración.

Se han desarrollado, recientemente, otros métodos para la separación de las proteínas tales como: la ultracentrifugación, la precipitación con alcohol, la cual se basa en la modificación del pH y variando las concentraciones de alcohol etílico, y el análisis inmunológico.

Rodkey, Rütstein, Bracken y Klotz, investigadores contemporáneos, han desarrollado una serie de métodos que aprovechan la capacidad de la albúmina de enlazar a ciertos colorantes específicos como son el Verde de Bromocresol, HABA, y Anaranjado de Metilo, dichos métodos son directos, es decir, no es necesario separarla para hacer la determinación

material y métodos

MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras utilizadas correspondieron a 250 pacientes pertenecientes a la consulta externa del centro de salud "Dr. Manuel Cárdenas de la Vega" de la Srfa. de Salubridad y Asistencia. La obtención de las muestras fue en condiciones basales.

La idea principal de este trabajo es la de comparar la confiabilidad del método de Rodkey (verde de Bromocresol) con el método de Reinhold (biuret), por lo que los pacientes no fueron clasificados de manera alguna.

Nuestro trabajo quedó dividido de la siguiente manera:

- 1.- Determinación de Proteínas Totales por el método de Kingsley y Reinhold utilizando el reactivo de biuret.
- 2.- Determinación de Albúmina por fraccionamiento salino; usando reactivo de biuret, y desarrollando el método de Kingsley y Reinhold.
- 3.- Determinación de Albúmina por el método de Rodkey (verde de bromocresol).
- 4.- Estudio del Método de Rodkey (verde de bromocresol) para albúmina.
 - a) Reproducibilidad del método.
 - b) Exactitud.
 - c) Espéctro de absorción.

5.- Comparación de los resultados utilizando la Distribución de Student (prueba de t).

1.- DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE KINGSLEY-REINHOLD.

2.- DETERMINACION DE ALBUMINA POR EL METODO DE KINGSLEY-REINHOLD.

FUNDAMENTO

Todas las proteínas contienen un gran número de enlaces peptídicos. Si se trata una solución de proteínas con iones Cu^{++} en un medio moderadamente alcalino, se forma un complejo quelato coloreado de composición desconocida, entre el ión Cu^{++} y los grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) y amina ($=\text{N}-\text{H}$) de los enlaces peptídicos. Ocurre una reacción análoga entre el ión cúprico y el compuesto orgánico biuret, $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{H}-\text{C}-\text{NH}_2$, por ello la reacción se llama de biuret.

Los aminoácidos y los dipéptidos no pueden dar la reacción, - pero tripéptidos, polipéptidos y proteínas dan productos de color violeta azulado procedentes del color del reactivo de biuret, que es azul dependiendo de la concentración de cobre del reactivo.

En la reacción de biuret un ión cúprico se une con 4 o 6 enlaces peptídicos por enlaces coordinados, acompañados por la pérdida de un protón de cada uno de los cuatro grupos de amida substituída, cuanto mayor es la cantidad de proteína presente, tanto más enlaces de péptido hay disponibles para la reacción.

La intensidad del color producido es proporcional al número de enlaces de péptido que experimentan reacción.

Así pues el método de biuret depende más del grupo de péptidos presentes que de la naturaleza de las cadenas presentes.

Por lo tanto dicho método puede usarse como base de un método colorimétrico simple y rápido para la determinación de proteínas de varias clases.

Basándose en esta reacción, se pueden determinar los componentes protéicos que son aislados por fraccionamiento salino, propiedades aprovechadas por Kingsley y Reinhold para desarrollar su técnica.

EQUIPO Y APARATOS

Espectrofotómetro E. Leitz.

Tubos de 13 x 100 mm.

Pipetas de 0.1 y 5.0 ml.

Centrífuga clínica (BMG).

Pipetas volumétricas de 1.0 ml.

Matríz aforado de 100 ml.

REACTIVOS

1.- Mezcla sulfato-sulfito.

Na ₂ SO ₄	26.0 g
Na ₂ SO ₃	0.6 g
H ₂ O c.b.p.....	100 ml

Ajustar el pH a 7-8 con hidróxido de sodio al 10% o ácido sulfúrico 2N según sea necesario.

Para determinar el pH de la solución, se toma una alícuota de 1.0 ml y se diluye con 25 ml de

agua y se mide el pH con papel.

2.- Eter Etilico anhidro, Q.P.

3.- Solución de aerosol 10%.

4.- Reactivo de biuret.

CuSO₄..... 1.5 g

Tartrato doble de Na,K 6.0 g

KI..... 1.0 g

NaOH al 10%..... 300 ml

H₂O, c.b.p..... 1000 ml

Disolver en el orden indicado en unos 500 ml de agua hasta agregar la solución de hidróxido de sodio, finalmente aforar al volumen especificado. Guardar en frasco de polietileno y dejar madurar un día.

5.- Patrón de referencia y calibración.

Monitrol II, con una concentración de 5.6 g/100 ml. para proteínas totales y 2.8 g/100 ml - para albúmina.

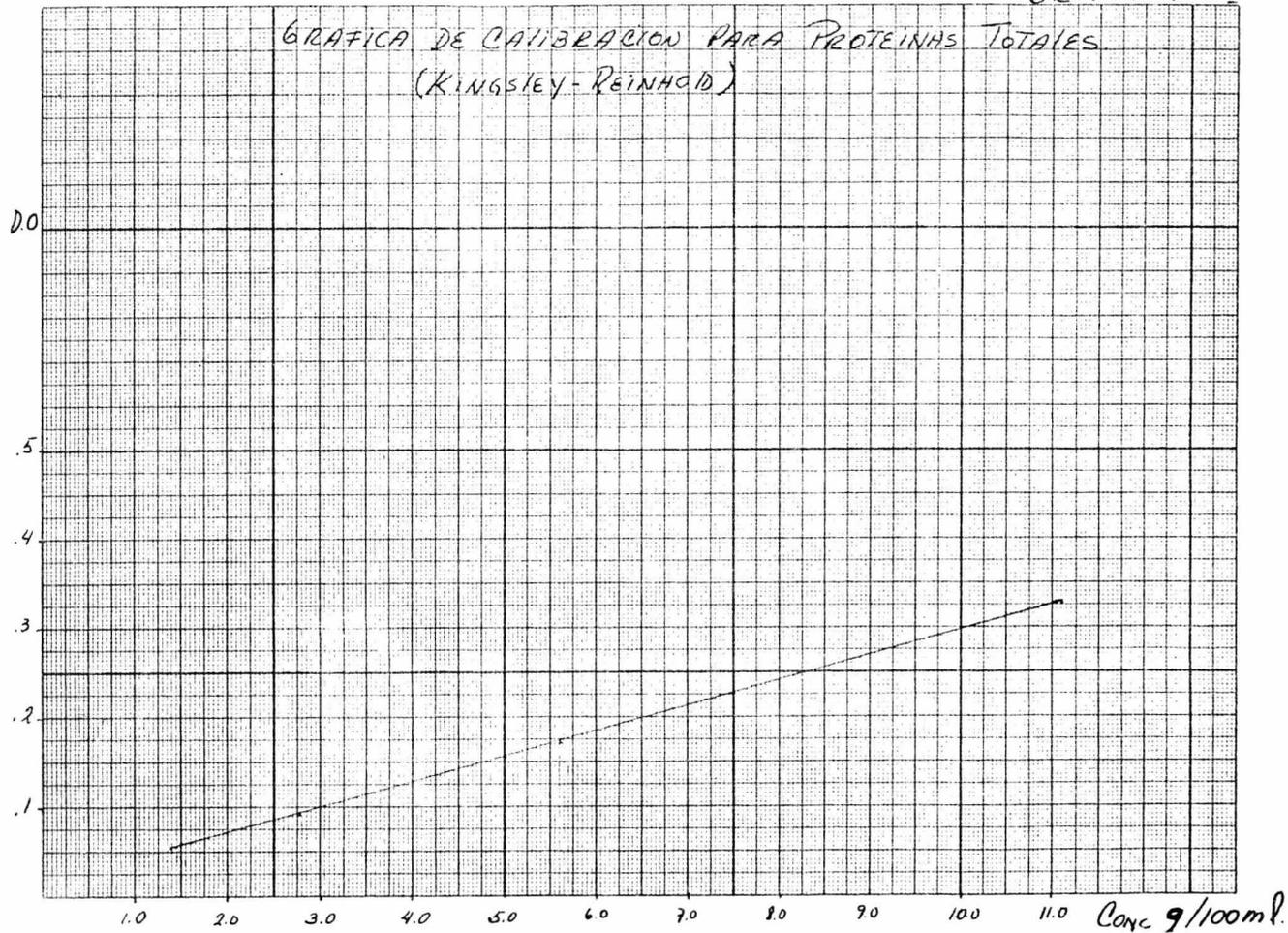
La gráfica de calibración para proteínas totales por el método de Kingsley y Reinhold se desarrolló de la siguiente forma:

PROTEINAS TOTALES

<u>TUBO</u>	<u>P A T R O N</u>	<u>D.O.</u>	<u>CONC.</u> <u>G/100 ml.</u>
1	0.5 ml.	.329	11.2
2	0.25 ml.	.174	5.6
3	0.25 ml. del tubo 2 dil. 1:2	.092	2.8
4	0.25 ml. del tubo 3 dil. 1:4	.051	1.4

GRAFICA #1

GRAFICA DE CALIBRACION PARA PROTEINAS TOTALES
(KINGSLEY-REINHOLD)



La gráfica de calibración para albúmina por el método de -
Kingsley y Reinhold se desarrolló de la siguiente forma:

ALBUMINA

<u>TUBO</u>	<u>P A T R O N</u>	<u>D.O.</u>	<u>CONC.</u> <u>g/100 ml.</u>
1	0.5 ml.	.149	5.6
2	0.25 ml.	.066	2.8
3	0.25 ml. del tubo 2 dil. 1:2	.032	1.4
4	0.25 ml. del tubo 3 dil. 1:4	.018	0.7

GRAFICA # 2

GRAFICA DE CALIBRACION PARA ALBUMINA. (KINGSLEY - REINHOLD)



TECNICA

- 1.- Colocar 0.25 ml. de suero problema o patrón como se indica en la gráfica de calibración en un tubo de 13 x 100 mm.
- 2.- Agregar 4.75 ml. de la solución sulfato-sulfito. Mezclar por agitación.
- 3.- Pasar 1.0 ml. a un tubo limpio y seco marcado con "P" para proteínas totales.
- 4.- Al residuo en el tubo original, agregar dos gotas de la solución de aerosol (para abatir la tensión superficial y evitar que se forme espuma) y 1.5 ml. de éter etílico, agitar suavemente, centrifugar a 2,500 r.p.m. x 5 min.
- 5.- Cuidando de no romper la capa de pasta formada por las globulinas precipitadas, tomar de la parte inferior y pasar 1.0 ml. a un segundo tubo marcado "A" para albúmina.
- 6.- En un tercer tubo marcado con "B" para el blanco, vaciar 1.0 ml de solución sulfato-sulfito.
- 7.- Agregar a cada uno de los tubos marcados 4.0 del reactivo de color, mezclar por inversión. Dejar reposar por 20 min.
- 8.- Leer en el espectrofotómetro a 535 nm, ajustando a 0.0 de D.O., con el tubo marcado con "B". Interpolar las lecturas en la gráfica de calibración para encontrar la concentración de las proteínas totales y albúmina. También pueden obtenerse dichos valores por medio de un patrón de referencia, empleado y tratado por la misma técnica simultáneamente.

CALCULOS

D.O. PROBLEMA

X CONCENTRACION DEL PATRON = CONCENTRACION g/100 ml.

D.O. PATRON

La concentración de globulinas se calcula por la diferencia entre la concentración de proteínas totales menos la albúmina.

La relación A/G es el coeficiente de la albúmina/globulina.

NOTA: La temperatura óptima para desarrollar la técnica es de 25-37 grados centígrados.

VALORES NORMALES

PROTEINAS TOTALES: 7-7.5 g/100 ml.

ALBUMINA: 4.5-5.5 g/100 ml.

3.- DETERMINACION DE ALBUMINA POR EL METODO DE RODKEY.

FUNDAMENTO

Todas las proteínas del plasma y especialmente la albúmina presentan una afinidad muy específica por los colorantes aniónicos orgánicos e inorgánicos, debido a fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van Der Waals y por la presencia de un puente de hidrógeno.

Diversos colorantes en su forma aniónica también, al igual que la bilirrubina, ácidos grasos, la mayoría de las hormonas, y muchas drogas, poseen la propiedad de ser transportados a través del organismo enlazados a la albúmina. Dicha propiedad fue utilizada intentando encontrar métodos en los que la albúmina pueda ser medida directamente sin la previa precipitación de globulinas.

En los métodos de enlace a colorante, solamente se pueden utilizar aquellos que se unan estrechamente con la molécula de albúmina, por lo que prácticamente el 100% de la albúmina presente se va a enlazar al colorante. El enlace no deberá de ser afectado por pequeñas cargas en fuerza iónica y por diferencias del pH. Por consiguiente el color de la unión proteína-colorante deberá de ser diferente al del colorante libre, deberá haber un cambio sustancial en la longitud de onda, en donde su máxima absorción ocurre en las dos formas, pudiendo por tanto ser medida la concentración de albúmina-colorante en presencia de exceso de colorante.

Finalmente, el enlace del colorante a otra fracción protéica (globulinas), deberá ser insignificante puesto que el enlace del colorante específico para la albúmina es debido a la carga neta de

la proteína, al pH al que se trabaja.

Por razones prácticas el color característico del colorante deberá ser de tal manera determinado a una longitud de onda en la que bilirrubina y hemoglobina nos de una mínima o insignificante interferencia.

Discombe (15), recomendó el método de Anaranjado de Metilo de Bracken y Klotz (1), después de haber probado otros colorantes. Algunas modificaciones de este método se han propuesto para dar resultados que estén de acuerdo con aquellos que se obtienen en métodos de fraccionamiento salino.

Otro método de enlace a colorante se ha recomendado por - - Rutstein, Ingénito, Reynolds y Martinek (12), y es el que emplea el 2(4'-hidroxiazobenceno) ácido benzóico, (HABA) y está descrito como más específico que el método de Anaranjado de Metilo y por último el método de verde de bromocresol ideado por Rodkey (9).

Recientemente ha sido descrito un nuevo método basado en la capacidad de la albúmina para enlazarse a la bilirrubina cuando ha sido equilibrada por una solución benzoica de este pigmento. El uso del verde de bromocresol está libre de la interferencia de pigmentos. La bilirrubina a niveles por arriba de 5mg/100 ml, interfiere con el método de HABA y en menor grado con el método de Anaranjado de Metilo. El uso de estos reactivos de color está bien establecido y se emplean en procedimientos manuales y automatizados.

En algunas ocasiones se han obtenido valores de albúmina anormalmente altos como resultado de la unión del colorante a otras - proteínas que no son albúmina. Las globulinas normales y algunas anormales no afectan en los valores de albúmina. Ocasionalmente para proteínas y macroglobulinas pueden interferir dando valores altos.

El enlace a colorante considerado como un fenómeno del equilibrio de disociación-asociación está influido por los cambios de - temperatura, un cambio de temperatura incrementa la disociación del colorante-albúmina, dando valores más bajos. Por lo tanto el patrón de referencia y el suero deberán ser corridos en las mismas condiciones. No debe usarse plasma heparinizado, porque la heparina por razones aun desconocidas rompe el enlace del colorante con la albúmina.

Cuando fueron normalizados los métodos de enlace a colorante con albúmina humana electroforéticamente pura, se observó que los niveles de albúmina por el método del Anaranjado de Metilo se veía aumentado de 0.2-0.3 g/100 ml. y por el método del HABA de 0.1-0.2 g/100 ml; que aquellos obtenidos por fraccionamiento salino o electroforesis, no obstante, encontramos reportes de valores obtenidos de cuando mucho 0.5 g/100 ml, por arriba.

EQUIPOS Y APARATOS

Espectrofotómetro E. Leitz.

Tubos de 13 x 100 mm

Pipetas de 0.01 ml (10 microlitros).

Pipetas de 5.0 ml.

REACTIVOS

1.- Verde de Bromocresol

Verde de Bromocresol...	1.0 g
Acido Láctico.....	52 ml
H ₂ O.....	200 ml
Tween No. 20	20 ml
H ₂ O c.b.p.....	2000 ml

Aforar casi hasta la marca ajus
tando el pH a 4 con aprox. 2 ml
de NaOH al 10% según sea neces
ario. Se deja madurar un día y
se guarda en refrigeración.

2.- Agua Destilada

3.- Patrón de referencia y calibración.

Monitrol II, con una concentra
ción de 2.8 g/100 ml. para al-
búmina.

La gráfica de calibración para albúmina por el método del Verde de Bromocresol se desarrolló de la siguiente manera:

ALBUMINA

<u>TUBO</u>	<u>P A T R O N</u>	<u>D.O.</u>	<u>CONC.</u> <u>g/100 ml.</u>
1	0.02 ml.	.502	5.6
2	0.01 ml.	.244	2.8
3	0.01 ml. del tubo 2 dil. 1:2	.114	1.4
4	0.01 ml. del tubo 3 dil. 1:4	.046	0.7

TECNICA

- 1.- Se marca un tubo de ensaye con "A" para albúmina, otro con "S" para el patrón y otro con "B" para blanco de reactivos.
- 2.- Al tubo marcado con "A" se le agrega 0.01 ml. de suero o plasma.
- 3.- Al tubo marcado con "S" se le agrega 0.01 ml. de la solución patrón.
- 4.- Al tubo marcado con "B" se le agrega 0.01ml. de agua destilada.
- 5.- A todos los tubos se les agrega 1.0 ml. del reactivo del verde de bromocresol y 4.0 ml. de agua destilada.
- 6.- Leer a longitud de onda de 630 nm, ajustando a 0.0 de D.O. con el blanco de reactivos obteniendo las concentraciones por medio de la curva de calibración o por medio de los siguientes cálculos.

CALCULOS

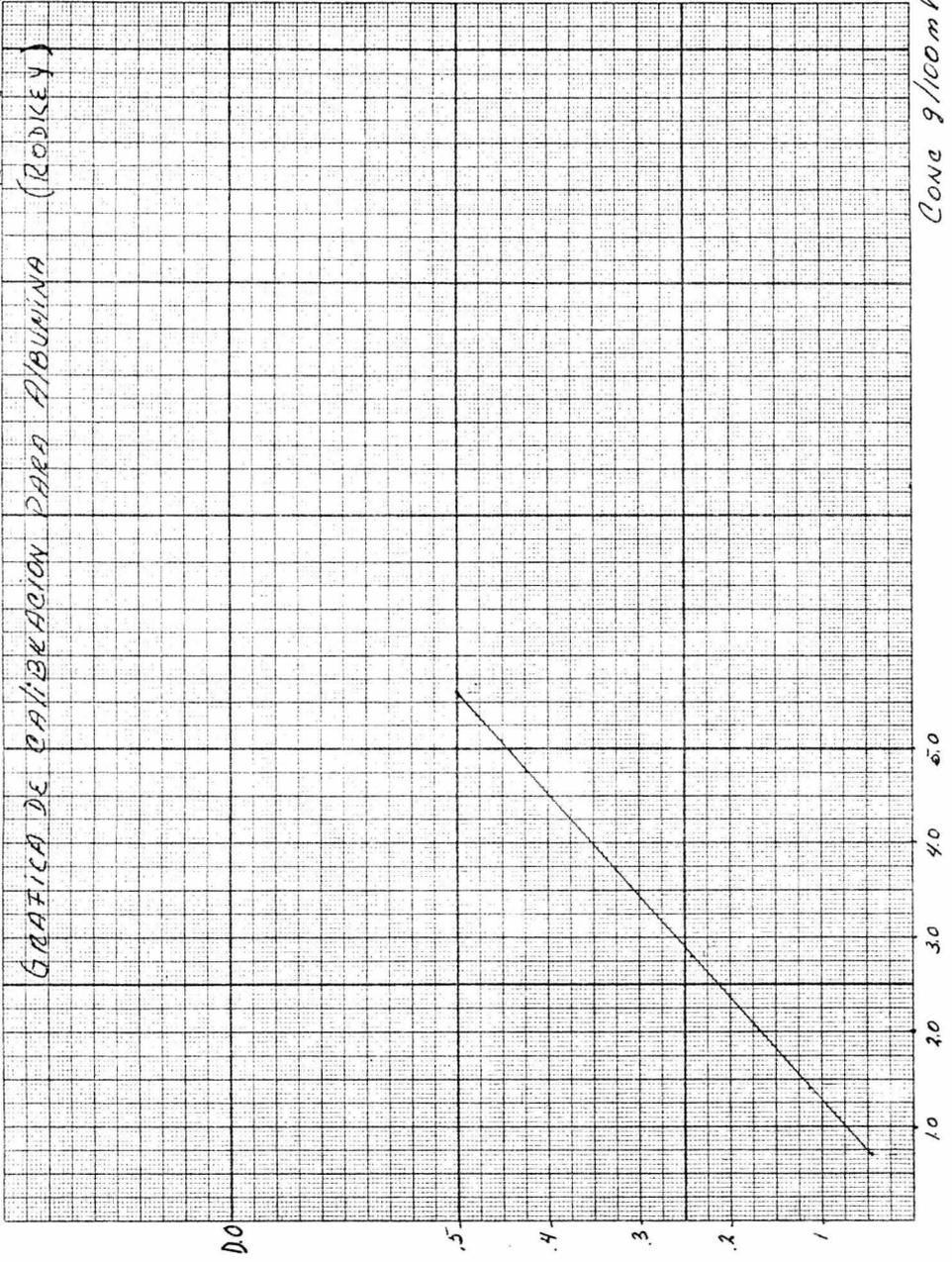
D.O. PROBLEMA X CONCENTRACION DEL PATRON = CONCENTRACION g/100 ml.
D.O. PATRON

VALORES NORMALES

ALBUMINA: 4.5-5.5 g/100 ml.

GRAFICA # 3

GRAFICA DE CALIBRACION PARA ALBUMINA (RODKEY)



Cone g/100ml.

A.- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE KINGSLEY-REINHOLD

B.- EXACTITUD

Los primeros cinco valores que se citan fueron obtenidos en una sola vez y el resto corriéndose como patrón de referencia cada vez que se desarrolló la técnica.

Los valores están dados en Densidad Optica y en g/100 ml.

<u>No.</u>	<u>D.O.</u>	<u>g/100 ml.</u>
1	.066	2.8
2	.066	2.8
3	.066	2.8
4	.066	2.8
5	.069	2.9
6	.066	2.8
7	.066	2.8
8	.066	2.8
9	.069	2.9
10	.063	2.7
11	.066	2.8
12	.066	2.8
13	.066	2.8
14	.063	2.7
15	.066	2.8
16	.066	2.8
17	.071	3.0
18	.063	2.7
19	.066	2.8
20	.066	2.8

MEDIA ARITMETICA = 2.805

DESVIACION ESTANDAR = 0.064

COEFICIENTE DE VARIACION = 2%

ERROR = 0.01

A.- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE RODKEY

B.- EXACTITUD

Los primeros cinco valores que se citan fueron obtenidos en una sola vez y el resto corriéndose como patrón de referencia cada vez que se desarrolló la técnica.

Los valores están dados en Densidad Optica y en $\sigma/100$ ml.

<u>No.</u>	<u>D.O.</u>	<u>$\sigma/100$ ml.</u>
1	.244	2.8
2	.244	2.8
3	.244	2.8
4	.240	2.7
5	.244	2.8
6	.252	2.9
7	.244	2.8
8	.244	2.8
9	.244	2.8
10	.237	2.7
11	.237	2.7
12	.244	2.8
13	.244	2.8
14	.252	2.9
15	.240	2.7
16	.244	2.8
17	.244	2.8
18	.244	2.8
19	.244	2.8
20	.244	2.8

MEIA ARITHMETICA = 2.79

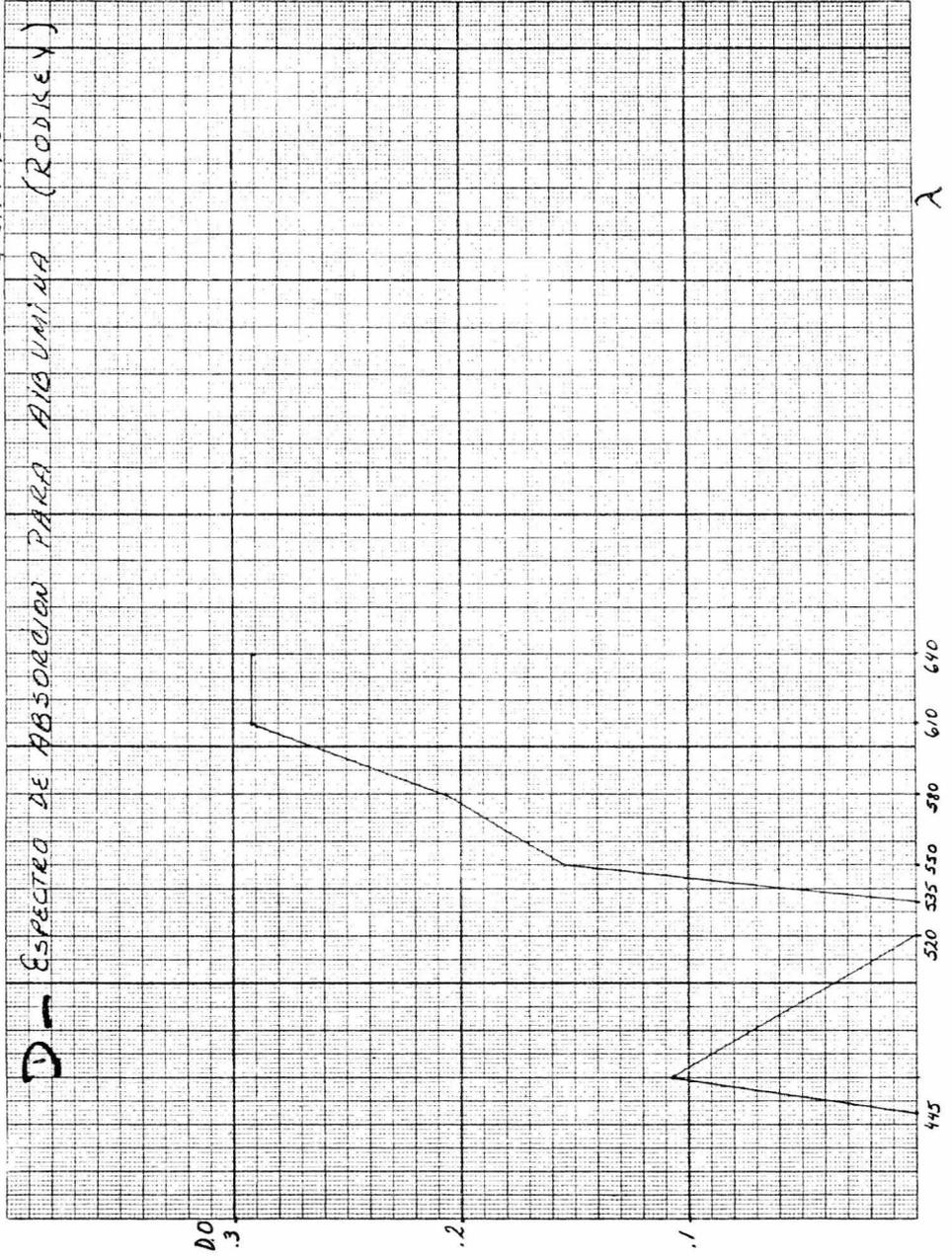
DESVIACION ESTANDAR = 0.046

COEFICIENTE DE VARIACION = 1.6%

ERROR = 0.01

GRAFICA #4

D - ESPECTRO DE ABSORCION PARA ALBUMINA (RODKEY)



resultados

TABLA No. 3

A continuación enumeramos los valores obtenidos: Por el método de Kingsley-Reinhold para proteínas totales (Columna I), albúmina - (Columna II), y relación A/G (Columna III). Por el método de Rodkey para albúmina (Columna IV) y relación A/G (Columna V). Todos los valores se expresan en g/100 ml.

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
1	9.3	4.5	0.9	4.4	0.9
2	8.6	4.3	1.0	4.0	0.8
3	8.6	5.0	1.3	5.1	1.3
4	8.6	4.3	1.0	4.0	0.8
5	8.6	4.3	1.0	4.2	0.8
6	8.6	4.3	1.0	4.3	1.0
7	8.6	4.4	1.0	4.3	1.0
8	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
9	8.3	4.3	1.0	4.5	1.1
10	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
11	8.3	3.9	0.8	3.9	0.8
12	8.3	4.5	1.1	4.4	1.1
13	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
14	8.3	4.3	1.0	4.5	1.1
15	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
16	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
17	8.3	4.3	1.0	4.3	1.0
18	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
19	8.3	5.3	1.7	5.2	1.7
20	8.3	5.5	1.9	5.6	2.0
21	8.0	4.8	1.5	4.8	1.5
22	8.0	4.5	1.4	4.5	1.4
23	8.0	4.8	1.5	4.8	1.5
24	7.9	5.3	2.0	5.0	1.7
25	7.9	5.0	1.7	4.8	1.5
26	7.9	5.1	1.8	5.0	1.7
27	7.9	4.1	1.0	4.0	1.0
28	7.9	4.8	1.5	4.8	1.5
29	7.9	5.0	1.7	4.9	1.7
30	7.9	3.4	0.7	3.6	0.8
31	7.9	5.0	1.7	4.9	1.7
32	7.9	4.8	1.5	4.8	1.5
33	7.9	5.2	1.9	5.0	1.7
34	7.9	5.0	1.7	5.0	1.7
35	7.9	5.0	1.7	4.9	1.6

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
36	7.9	5.0	1.7	5.0	1.7
37	7.9	4.1	1.0	4.0	1.0
38	7.9	5.0	1.7	5.0	1.7
39	7.8	4.5	1.3	4.2	1.1
40	7.8	4.8	1.6	4.7	1.5
41	7.8	3.9	1.0	4.2	1.1
42	7.8	5.0	1.7	4.9	1.6
43	7.8	5.0	1.7	4.9	1.6
44	7.8	5.0	1.7	5.0	1.7
45	7.8	4.5	1.3	4.2	1.1
46	7.8	5.0	1.7	5.2	2.0
47	7.8	5.2	1.8	5.2	1.8
48	7.8	3.9	1.0	3.8	0.9
49	7.8	5.0	1.7	4.8	1.6
50	7.8	3.9	1.0	4.2	1.1
51	7.8	4.5	1.3	4.3	1.2
52	7.8	3.9	1.0	3.7	0.9
53	7.8	3.9	1.0	3.9	1.0
54	7.8	5.0	1.7	4.9	1.6
55	7.8	5.0	1.7	5.0	1.7
56	7.8	4.5	1.3	4.5	1.3
57	7.8	5.0	1.7	5.0	1.7
58	7.8	5.5	2.3	5.6	2.3
59	7.8	5.0	1.7	5.2	2.0
60	7.8	3.9	1.0	3.8	0.9
61	7.8	5.0	1.7	5.0	1.7
62	7.8	4.8	1.6	4.7	1.5
63	7.8	4.3	1.2	4.7	1.5
64	7.6	4.8	1.7	4.7	1.6
65	7.6	3.7	0.9	3.8	1.0
66	7.6	4.3	1.3	4.3	1.3
67	7.6	4.8	1.7	5.2	2.1
68	7.6	5.3	2.3	5.2	2.1
69	7.6	4.7	1.6	4.8	1.7
70	7.6	4.5	1.4	4.4	1.4
71	7.6	3.7	0.9	3.8	1.0
72	7.6	4.7	1.6	4.7	1.6
73	7.6	5.1	2.0	5.2	2.1
74	7.6	4.3	1.3	4.3	1.3
75	7.6	4.3	1.3	4.3	1.3
76	7.6	4.8	1.7	4.7	1.6
77	7.6	4.8	1.7	4.7	1.6
78	7.6	4.8	1.7	4.8	1.7
79	7.6	5.1	2.0	5.2	2.1
80	7.6	5.3	2.3	5.2	2.1
81	7.6	4.7	1.6	4.8	1.7
82	7.6	3.6	0.9	3.7	0.9
83	7.6	5.0	1.9	5.0	1.9
84	7.6	5.1	2.0	5.2	2.1
85	7.6	3.9	1.0	3.7	0.9

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
86	7.6	3.9	1.0	3.9	1.0
87	7.6	4.3	1.3	4.3	1.3
88	7.6	4.8	1.7	4.8	1.7
89	7.5	4.5	1.5	4.5	1.5
90	7.4	4.3	1.3	4.2	1.3
91	7.4	3.7	1.0	3.6	0.9
92	7.4	4.4	1.4	4.5	1.4
93	7.4	4.3	1.3	4.2	1.3
94	7.4	4.4	1.4	4.5	1.5
95	7.3	4.5	1.6	4.6	1.7
96	7.3	3.4	0.8	3.3	0.8
97	7.3	4.8	1.9	4.9	1.9
98	7.3	3.9	1.1	4.3	1.4
99	7.3	4.1	1.2	3.9	1.1
100	7.3	4.1	1.2	4.4	1.5
101	7.3	5.5	3.0	5.6	3.2
102	7.3	4.3	1.4	4.0	1.2
103	7.3	5.0	2.1	4.8	1.9
104	7.3	5.0	2.1	5.0	2.1
105	7.3	5.3	2.6	5.0	2.1
106	7.3	5.5	3.0	5.6	3.2
107	7.3	5.5	3.0	5.6	3.2
108	7.3	4.5	1.6	4.6	1.7
109	7.3	4.3	1.4	4.3	1.4
110	7.3	4.1	1.2	3.9	1.1
111	7.3	4.1	1.2	4.0	1.2
112	7.3	5.0	2.1	4.9	1.9
113	7.3	5.0	2.1	5.0	2.1
114	7.3	5.0	2.1	5.0	2.1
115	7.3	5.0	2.1	5.0	2.4
116	7.3	4.5	1.6	4.5	1.6
117	7.3	3.4	0.8	3.3	0.8
118	7.2	4.7	1.8	4.9	2.1
119	7.2	4.1	1.3	3.9	1.2
120	7.2	3.9	1.1	3.7	1.1
121	7.2	4.1	1.3	3.9	1.2
122	7.2	4.1	1.3	3.9	1.2
123	7.2	4.1	1.3	3.9	1.2
124	7.1	3.9	1.2	3.8	1.1
125	7.1	3.6	1.0	3.7	1.0
126	7.1	3.9	1.2	4.0	1.2
127	7.1	3.4	0.9	3.4	0.9
128	7.1	3.9	1.2	4.0	1.2
129	7.1	3.0	0.7	3.2	0.8
130	7.1	4.5	1.7	4.6	1.7
131	7.1	4.8	2.0	4.6	1.7

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
132	7.1	4.3	1.5	4.4	1.5
133	7.1	3.9	1.2	3.9	1.2
134	7.1	4.5	1.7	4.4	1.5
135	7.1	4.5	1.7	4.3	1.4
136	7.1	3.4	0.9	3.3	0.9
137	7.1	4.8	2.0	4.6	1.7
138	7.1	5.0	2.3	5.2	2.7
139	7.1	4.8	2.0	4.5	1.7
140	7.1	4.3	1.5	4.2	1.4
141	7.1	4.1	1.3	4.3	1.5
142	7.1	3.9	1.2	3.7	1.0
143	7.1	5.0	2.3	5.0	2.3
144	7.1	3.6	1.0	3.7	1.0
145	7.1	4.3	1.5	4.2	1.4
146	7.1	3.9	1.2	3.8	1.1
147	7.1	3.4	0.9	3.3	0.8
148	7.1	4.1	1.3	4.2	1.4
149	7.1	4.8	2.0	4.8	2.0
150	7.1	4.5	1.7	4.5	1.7
151	7.1	4.8	2.0	4.6	1.8
152	7.1	3.2	0.8	3.3	0.8
153	7.1	3.0	0.7	3.2	0.8
154	7.1	4.5	1.7	4.6	1.8
155	7.1	4.8	2.0	4.6	1.8
156	7.1	4.3	1.5	4.4	1.5
157	7.1	3.9	1.2	3.9	1.2
158	7.1	4.5	1.7	4.4	1.5
159	7.1	4.8	2.0	4.8	2.0
160	7.1	4.8	2.0	4.8	2.0
161	7.1	4.3	1.5	4.3	1.5
162	7.1	4.5	1.7	4.5	1.7
163	7.1	4.6	2.0	4.8	2.0
164	7.1	3.9	1.2	4.0	1.2
165	7.1	3.4	0.9	3.3	0.8
166	7.1	3.4	0.9	3.3	0.8
167	6.9	5.0	2.6	5.0	2.6
168	6.9	4.4	1.7	4.5	1.8
169	6.9	3.2	0.8	3.4	0.9
170	6.9	3.9	1.3	3.9	1.3
171	6.9	5.0	2.6	5.0	2.6
172	6.9	3.8	1.2	3.7	1.2
173	6.9	4.1	1.4	4.0	1.4
174	6.9	5.3	3.3	5.0	1.6
175	6.9	4.1	1.4	4.3	1.6
176	6.9	4.5	1.8	4.6	2.0
177	6.9	3.0	0.7	2.9	0.7
178	6.9	4.1	1.4	4.0	1.4
179	6.9	4.4	1.7	4.4	1.7
180	6.9	4.4	1.7	4.3	1.6
181	6.9	3.2	0.8	3.3	0.8

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
182	6.9	4.5	1.8	4.5	1.8
183	6.9	3.6	1.0	3.6	1.0
184	6.9	3.9	1.3	3.9	1.3
185	6.9	4.1	1.4	4.0	1.3
186	6.9	3.6	1.0	3.6	1.0
187	6.9	3.0	0.7	3.2	0.8
188	6.9	4.5	1.8	4.5	1.8
189	6.9	3.0	0.7	3.0	0.7
190	6.9	3.9	1.3	3.9	1.3
191	6.9	5.0	2.6	5.0	2.6
192	6.7	4.1	1.5	4.2	1.6
193	6.7	3.6	1.1	3.6	1.1
194	6.7	3.4	1.0	3.6	1.1
195	6.7	3.0	0.8	3.2	0.9
196	6.7	4.1	1.5	4.2	1.6
197	6.7	3.6	1.1	3.7	1.2
198	6.7	4.1	1.5	4.2	1.6
199	6.7	3.9	1.4	4.3	1.8
200	6.6	3.5	1.1	3.6	1.2
201	6.6	3.6	1.2	3.6	1.2
202	6.6	3.4	1.0	3.6	1.2
203	6.6	4.6	2.3	4.5	2.1
204	6.6	3.8	1.4	3.8	1.4
205	6.6	3.5	1.1	3.6	1.2
206	6.6	4.8	2.6	4.9	2.8
207	6.6	3.6	1.2	3.6	1.2
208	6.6	3.4	1.0	3.6	1.2
209	6.5	4.3	1.9	4.1	1.6
210	6.5	4.3	1.9	4.2	1.8
211	6.4	2.8	0.7	2.9	0.8
212	6.4	2.8	0.7	2.9	0.8
213	6.4	3.5	1.2	3.6	1.2
214	6.4	4.1	1.7	4.4	2.2
215	6.4	3.5	1.2	3.3	1.0
216	6.4	2.8	0.7	2.9	0.8
217	6.4	2.8	0.7	2.8	0.7
218	6.4	4.1	1.7	4.2	1.9
219	6.4	2.8	0.7	2.8	0.7
220	6.4	3.5	1.2	3.7	1.3
221	6.4	4.1	1.7	4.0	1.6
222	6.4	3.5	1.2	3.3	1.0
223	6.4	3.5	1.2	3.6	1.2
224	6.3	3.4	1.1	3.5	1.2
225	6.2	3.4	1.2	3.4	1.2
226	6.2	4.2	2.0	4.2	2.0
227	6.2	4.1	1.9	4.3	2.2
228	6.2	3.9	1.1	3.9	1.1
229	6.2	3.0	0.9	3.3	1.1
230	6.2	3.4	1.2	3.4	1.2

<u>No.</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
231	6.2	3.4	1.2	3.4	1.2
232	6.2	4.1	1.9	4.3	2.2
233	6.2	2.8	0.8	3.0	0.9
234	6.2	3.9	1.6	3.9	1.6
235	6.1	2.5	0.6	2.9	0.9
236	6.1	2.8	0.8	2.9	0.9
237	6.1	2.8	0.8	2.9	0.9
238	6.1	2.8	0.8	2.9	0.9
239	6.0	3.4	1.3	3.3	1.2
240	6.0	3.4	1.3	3.7	1.6
241	6.0	4.1	2.1	4.0	2.0
242	6.0	3.6	1.5	3.7	1.6
243	6.0	3.4	1.3	3.6	1.5
244	6.0	4.1	2.1	4.0	2.0
245	6.0	4.1	2.1	4.2	2.3
246	6.0	3.4	1.3	3.7	1.6
247	6.0	4.1	2.1	4.0	2.0
248	5.7	3.8	2.1	3.6	1.9
249	5.5	3.9	2.4	3.6	1.8
250	5.4	2.8	1.0	2.9	1.1

METODO DE KINGSLY-REINHOLD.

MEDIA ARITMETICA. = 4.2488

DESVIACION ESTANDAR. = 0.6931

ERROR. = 0.0438

METODO DE ROEFY.

MEDIA ARITMETICA. = 4.246

DESVIACION ESTANDAR. = 0.6707

ERROR. = 0.404

resumen y conclusiones

DISCUSION.

El objetivo principal de nuestro estudio consistió en comparar la confiabilidad del método de Kingsley-Reinhold y el método de Rodkey para la determinación de albúmina.

El estudio de los métodos fué realizado con 250 muestras obtenidas de pacientes de la consulta externa del centro de salud "Dr. Manuel Cardenas de la Vega" de la Sria. de Salubridad y Asistencia., cuyos resultados observamos en la Tabla No. 3.. En la que se reportan las cifras obtenidas de estas determinaciones por el método de Kingsley-Reinhold, los resultados se insertan en orden decreciente con respecto a los valores obtenidos para Proteínas Totales y Albúmina, de acuerdo a estos datos se calcularon: la media aritmética (4.2488), la desviación estándar (± 0.6931) y el error del método (± 0.0438).

Estos valores fueron calculados con la intención de hacer una comparación estadística de grupo..

En la Tabla No. 3 Asimismo se dan los valores de albúmina por el método de Rodkey e igualmente se reporte la relación A/G, donde observamos que al hacer la estadística de esta relación encontramos: Media Aritmética (4.246), desviación estándar (± 0.6707), y error (± 0.0424).

A la revisión de los resultados obtenidos por los dos métodos, observamos, en cuanto a la relación albúmina-globulina, en que podemos citar los casos 2, 4, 5, 67, 137, 248, y 249, que se aprecia una variación de 0.1 a 0.3 en ellos pero al mis-

mo tiempo podemos citar que esto no representa una variación significativa en cuanto a la valoración del paciente.

Probablemente la diferencia encontrada pueda deberse a errores técnicos fortuitos ya que en los demás casos se observa un paralelismo en los datos.

Aplicando la T de Student para la comparación entre grupos vemos que la diferencia obtenida no es significativa, por lo tanto, podremos utilizar indistintamente un método u otro para la valoración cuantitativa de albúmina.

También presentamos la reproducibilidad y la exactitud de los dos métodos la cual fue realizada con un patrón de concentración conocida, en donde observamos de acuerdo a la Tabla No. 1 y 2, que la precisión observada es de 0.064 y 0.046 y con un coeficiente de variación de 2% lo que nos da la confiabilidad del método.

En las gráficas 1 y 2 presentamos las gráficas de calibración para proteínas totales y albúmina por el método de Kingsley y Reinhold y en la gráfica 3 presentamos la de albúmina por el método de Rodkey. En las tres gráficas observamos la linealidad de los métodos y por lo tanto siguen la ley de Beer-Lambert.

En la gráfica No. 4 presentamos el espectro de absorción para albúmina por el método del verde de bromocresol de Rodkey, donde vemos que la máxima absorción producida por la absorción colorida es entre 610 y 640 nm como está expresado en la técnica original, nosotros utilizamos una longitud de onda de 630 nm.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.- Se presentan en este trabajo generalidades sobre las proteínas plasmáticas, origen, estructura, funciones y alteraciones.
- 2.- Una breve historia sobre la separación de las proteínas.
- 3.- Se describen con detalle las técnicas para la determinación de proteínas y albúmina por el método de Kingsley y Reinhold y albúmina por el método de Rodkey.
- 4.- Se reportan los resultados obtenidos por los dos métodos en estudio así como la media aritmética, la desviación estándar, el error y la distribución de Student.
- 5.- Se presenta una breve discusión sobre los resultados obtenidos.

Por los datos obtenidos anteriormente podemos pensar que el método que originó nuestro estudio que es el de Rodkey que fue comparado con el de Kingsley-Reinhold, puede utilizarse como método de rutina en laboratorios de análisis clínicos ya que no observamos diferencia significativa entre ellos y que debido al menor número de manipulaciones y tiempo quizá pronto desplacen al clásico método de fraccionamiento salina.

bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bracken, J.S., and Klotz, I.M.: A simple method for the rapid determination of serum albumin. *Am.J.Clin.Pat.* 23 ; 1055-1058, 1953.
- 2.- Conn. Eric.E., Stumpf, P.K.: *Bioquímica Fundamental*. Ed-Limusa Weley, S.A. México, 1972.
- 3.- Gornal, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J.Biol. Chem.*, 177 : 751, 1949.
- 4.- Mc Gilvery.W.R.: *Bioquímica*. Ed. Interamericana. México, 1972.
- 5.- Miyada. Don.S., Baysinger Vernon., Notrica. S. and Nakamura. R.M.: Albumin Quantitation by dye binding and salt fractionation techniques. *Clin.Chem.* 18 : 1, 1972.
- 6.- Pastewka.J.V. and Ness.A.T.: The determination of human serum albumin by its specific binding of the anionic dye. *Clin.Chem.Acta.* 12: 532-541, 1965.
- 7.- Reinhold, J.G.: Total protein, albumin and globulin. En *Standard Methods of Clinical Chemistry*.D.Seligson, Ed. New York, Academic Press Inc., 88 : 1, 1953.
- 8.- Robins, Stanley. L.: *Textbook of Pathology*.W.B. Saunders Co. Philadelphia. 1964.

- 9.- Rodkey, Lee.F.: Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. Clin.Chem. 11 : 478, 1965.
- 10.- Rodkey, Lee.F.: Determination of albumin in human plasma and serum. Abstracts from scientific session. 10 : 7, 1964.
- 11.- Itzhaki, Ruth. I., and Gill, D.M.: A microbiuret method for estimating proteins. Analytical biochemistry. 9 ; 401-410, 1964.
- 12.- Rutstein, D.R., Ingenito, E.F., Reynolds, W.E., and Burke, J.L.: The determination of albumin in human blood plasma and serum. A method based in the interaction of albumin with an anionic dye 2(4'- Hidroxi-bencenazo) benzoic acid. J. Clin. Invest. 33 ; 211-221, 1954.
- 13.- Dumas, B.T., Watson, W.A., and Biggs, H.G.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chem. Acta. 31 : 87, 1971.
- 14.- Velez, Grosco.F. Apuntes de la Materia, Fac. de Quimica. 1969.
- 15.- Watson.D. and Nankville Dianne .D. Determination of plasma albumin by dye binding and other methods. Clin. Chem.Acta. 9 : 359-363, 1964.