



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

González-Pérez, Maritza; González-Hernández, Raúl; Revilla-Fernández, Yenisleidy; Mayo-Abad, Orestes

Determinación de la acidificación permisible a la sangre bovina para la cuantificación de hemoglobina mediante la técnica de drabkin

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 43, núm. 2, mayo-agosto, 2012, pp. 1-5

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181223782006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Determinación de la acidificación permisible a la sangre bovina para la cuantificación de hemoglobina mediante la técnica de drabkin

Maritza González-Pérez, Raúl González-Hernández, Yenisleidy Revilla-Fernández, Orestes Mayo-Abad.

Centro Nacional de Biopreparados. Laboratorio de Reconstituyentes, Dirección de Investigaciones, Carretera Beltrán kilómetro 1½, Bejucal, Mayabeque.

Recibido: 20 de octubre de 2011.

Aceptado: 3 de mayo de 2012.

Palabras clave: cianometahemoglobina, hemoglobina, Drabkin, sangre.
Key words: cyanmethaemoglobin, haemoglobin, Drabkin, blood.

RESUMEN. La técnica de *Drabkin* es la más comúnmente empleada dentro del laboratorio clínico para la cuantificación de la hemoglobina (Hb) en la sangre. El autor de la técnica original estableció su realización a pH 7,2 debido a la dilución de la sangre que se produce por los reactivos empleados en ella, puesto que su pH original está entre 7,3 y 7,4 y su utilización solo se limita a este fin. En muchos trabajos de investigación, se emplea la sangre bovina como materia prima, para el aislamiento y extracción de sus diversos componentes; por lo que esta técnica, es frecuentemente utilizada, para la cuantificación de hemoglobina en disoluciones tratadas a distintos pH con diferentes fines. El objetivo de este trabajo consistió en determinar el grado de acidez máximo permisible en que la técnica cuantifica correctamente la concentración de Hb. El estudio se realizó con un patrón de hemoglobina y con hemoglobina bovina liofilizada con un 90% de pureza, con vistas a eliminar interferencias que pudieran aportar las proteínas procedentes de la sangre y los fosfolípidos procedentes de la membrana celular de los eritrocitos. Los resultados mostraron que la técnica sobreestima la concentración de las muestras a pH inferiores a 4,0 por lo que no se recomienda su uso en este intervalo de pH. Estos resultados no han sido reportados con anterioridad por lo que pudieran ser de gran utilidad en futuras investigaciones.

ABSTRACT. The *Drabkin* technique for the determination of cyanmethaemoglobin constitutes the most common technique employed, in the clinical laboratory for the quantification of haemoglobin (Hb). The author of the original technique established its performing at pH 7,2 because of the blood dilution as a result of the chemical compound employed in it; although, the original blood pH is between 7,3 to 7,4 and the technique utilization was limited only to this end. In many research works, blood is utilized as a raw material for the isolation and extraction of different components; therefore, this technique is frequently used for the quantification of haemoglobin in dissolutions treated at different pH with diverse purposes. The objective of this work consisted in determining the maximum acidity degree permissible where this technique calculates the haemoglobin concentration correctly. This study was carried out with haemoglobin standard and the lyophilized bovine hemoglobin with 90% of purity to eliminate the possible interferences brought by the proteins from the blood and phospholipids from the erythrocytes cell membrane. The results showed that the technique calculates the concentration of the samples, higher than the correct values, for the pH lesser than 4,0; therefore it is not recommended its use at pH lower than 4,0. These results have not been previously reported, for that they would be very useful in future researches.

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de hemoglobina, por la técnica de cianometahemoglobina, constituye un método de rutina en los laboratorios clínicos por su amplia utilización.¹ Fue descrita por primera vez por Drabkin y cols. en 1932, para la determinación de hemoglobina en seres humanos, perros y conejos,² desde entonces y hasta el presente, sigue siendo la técnica más utilizada con este propósito. Su empleo, no solo se limita a la sangre humana como un importante indicador de salud, sino que debido a su basamento técnico, es posible emplearla también para determinar la concentración de hemoglobina en la sangre de animales;^{3,4} debido a que el grupo hemo (donde se encuentra el hierro que se oxida y forma la cianometahemoglobina, cuya cuantificación, es la base del método), presenta la misma estructura molecular para la sangre de todas las especies que contienen este grupo.⁵⁻⁷

Para cuantificar la hemoglobina proveniente de la sangre bovina, se ha utilizado este procedimiento con resultados satisfactorios, como indicador de calidad básico, para el empleo de ella como materia prima en la elaboración de medicamentos y suplementos cuya base es de hierroHemínico como el Trofin[®].⁸

Para el desarrollo de la técnica se emplean diferentes iones de diagnósticos entre ellos, el Hemastat[®] de

de la sulfohemoglobina.^{2,10,11} El pH de la sangre del bovino se encuentra entre 7,35 y 7,50; condiciones fisiológicas producidas por la capacidad hidrogenocarbonato y de la misma hemoglobina,⁵ de actuar como estabilizadores de varios componentes de la sangre, tales como las proteínas, del sistema sin embargo, se ha observado que en la sangre extraída tiende a producirse un descenso de pH (desde 7,2 hasta 6,2) debido a la utilización de anticoagulantes en ella. Algunos autores plantean que pudiera ser estimada la concentración fisiológica de Hb a un pH dado, las células rojas serán esféricas, pero no se lisarán.¹² Cuando las células se enfrentan a una disolución ligeramente ácida (que no afecte la estructura de la molécula de Hb), el ácido penetra, se equilibra su concentración en ambos lados de la pared del eritrocito y disminuye el pH en el interior de la célula. Como la molécula pertenece a un sistema estabilizador en la sangre, la Hb por su actividad como tal actúa sobre la desviación del pH desde los valores fisiológicos, se desnaturaliza e incrementa su contribución a la presión osmótica. La cinética de la lisis depende de la desviación de los indicadores de las células rojas de la sangre sus valores normales, entre los que se consideran, el pH alrededor de 7,2 y la presión osmótica dentro y fuera del eritrocito deberá ser igual para que mantenga íntegra su pared y no ocurra su lisis.¹²

El objetivo de este trabajo consistió en determinar, el grado máximo de acidez permisible, en que la técnica de *Drabkin* determina con exactitud la concentración de Hb en la sangre bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

Sangre bovina Se emplearon seis lotes de sangre bovina estériles.

Reactivos Patrón de referencia de cianometahemoglobina en ampollas (57,2 mg/100 mL) (BDH); HCl 0,1 mol/L y hemoglobina bovina liofilizada (pureza superior al 90 %) (Fluka).

Métodos

Determinación de la concentración de Hb.

El principio del método se basa en que el hexacianoferrato (III) de potasio, oxida el hierro (II) del grupo hemo de la Hb a hierro (III), con lo que se forma la metahemoglobina, la cual se combina con el cianuro de potasio a pH 7,2 para producir la cianometahemoglobina, complejo de color rojo cuya intensidad de absorción se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm y es proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra de sangre.² Para cuantificar la hemoglobina se empleó el juego de diagnóstico Hemotest (Helfa Diagnóstico)⁹ y como patrón de referencia la cianometahemoglobina en ampollas a la concentración de 57,2 mg/100 mL (BDH). El procedimiento para la determinación y el cálculo de la concentración de Hb, se realizó de acuerdo con lo referido en el prospecto del reactivo.

Preparación del patrón de Hb.

Se procedió a preparar una curva patrón de Hb a partir del contenido de un ampolla de hemoglobina de concentración conocida, el cual se disolvió con agua destilada hasta alcanzar las concentraciones referidas en la preparación de la curva patrón.

Preparación de la curva patrón

Puntos de la curva	Concentración
1,5 mL	17,16 mg / 5 mL
3,0 mL	34,32 mg / 5 mL
4,5 mL	51,48 mg / 5 mL

Preparación de la disolución de Hb liofilizada al 2,5; 5 y 10%.

Se pesó la Hb liofilizada 0,5g y se disolvió en 5mL de agua destilada (disolución al 10%), se realizaron diluciones dobles para preparar una disolución al 5% y otra al 2,5%. Una vez elaborada la curva patrón, se determinó la concentración de Hb en cada una de las disoluciones preparadas a las distintas concentraciones con la utilización de un Espectrofotómetro Pharmacia (Modelo Ultrospect 2000) y a 540 nm. Se realizaron los cálculos según la expresión:

$$C_m = A_m \cdot \frac{C_r}{A_r}$$

donde:

C_m Concentración de Hb (g/L).

A_m Absorbancia de la muestra de ensayo.w

C_r Concentración de Hb en la disolución de referencia (g/L)

A_r Absorbancia de la disolución de referencia.

Preparación de la disolución de Hb liofilizada al 5 % y acidificación.

Se pesaron 25g de Hb en un vaso de precipitado de 1000 mL. Se disolvieron con 300 mL de agua destilada. La disolución se trasvasó a un matraz de 500mL y se enrasó a este volumen. Se prepararon tres réplicas de la disolución de Hb al 5% de cada pH con un volumen de 15 mL cada una y se ajustó a pH 2, 3, 4, 5 y 6 con HCl 0,1 mol/L. Se determinó la concentración de Hb de las disoluciones ajustadas utilizando el patrón de Hb.

Preparación de las muestras de sangre bovina.

Se centrifugaron 50mL de sangre bovina estéril, los eritrocitos respectivos se lavaron tres veces con disolución de NaCl al 1,2%. Del precipitado obtenido se tomaron 25 mL y se añadieron en 250 mL de agua destilada. Se agitó durante 10 min y se centrifugó a 10 000 r/min durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante correspondiente a la hemoglobina contenida dentro de los eritrocitos. Se prepararon las disoluciones de los primeros tres lotes con 15 mL de Hb y se ajustaron a pH 2, 3, 4, 5 y 6; (tres réplicas para cada pH) con HCl 0,1 mol/L. Se realizó la operación en un recipiente de plástico que no reacciona con el acido. (HCl 0,1 mol/L, 15 mL, 10 min a 4°C). A continuación se centrifugó a 10 000 r/min durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante correspondiente a la hemoglobina contenida dentro de los eritrocitos.

Análisis estadístico: En los análisis estadísticos, se empleó el programa Centurión XV y se aplicó la prueba de Múltiples Rangos para la comparación de varias muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

La curva de calibración preparada como base para el cálculo de las concentraciones de Hb tuvo una $R^2 = 0,999$, lo que confirmó una alta confiabilidad en los resultados que se obtuvieron a partir de ella.

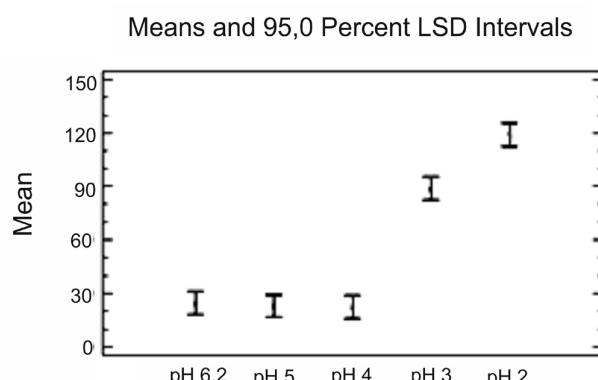
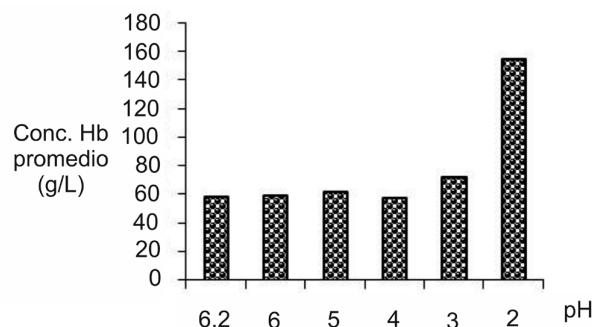
Al analizar los resultados esperados de concentración de Hb, contra los calculados,² a disoluciones de 2,5, 5 y 10% a partir de Hb bovina liofilizada, se observó que la disolución de Hb al 5% presentó exactamente los 50 g/L que contenía, la del 10% presentó 96 g/L y la de 2,5 %presentó 26 g/L; algo por encima de la concentración esperada, por ello, se escogió la del 5% como la concentración de trabajo para el experimento con las diferentes variantes de pH (Tabla 1).

Los resultados de la determinación de la concentración de Hb de la disolución de Hb liofilizada al 5% , para el experimento de variación del pH desde pH 2 hasta pH 6 y su comparación con la concentración de Hb de la

Tabla 1. Concentración de Hb bovina liofilizada calculada contra obtenida.

Conc. Hb liofilizada Calculada (%)	Abs (540nm)	Conc. Hb obtenida (g/L)
10	0,2	95,98
5	0,097	50,00
2,5	0,044	26,33

disolución a pH 6,2 (que corresponde a la muestra natural sin ajuste de pH), expresan que a pH < 4 comienza a aumentar la concentración de hemoglobina y cada vez se alejan más del valor de la muestra sin acidificar que se corresponde al obtenido a pH 6,2 (Figura 1). Algunos autores¹³ plantean que los estabilizadores fisiológicos son la primera línea de defensa frente a los cambios de pH de los fluidos biológicos entre los que destacan: el fosfato, el hidrogenocarbonato y el de hemoglobina; este último realiza su función cuando se favorece la captación o la liberación del oxígeno de la Hb según estén presentes los iones H⁺ o el CO₂ a este fenómeno se le denomina efecto Bohr, pero cuando se une la Hb a iones H⁺ se produce un efecto en el equilibrio del estabilizador hidrogenocarbonato, se induce la formación de este, que no permite variaciones en el pH; por lo tanto, si la Hb que se trabaja está fuera del organismo, el mecanismo estabilizador del hidrogenocarbonato es limitado, una vez que se agote él, cuando se acidifique el medio en la disolución de trabajo, podrán producirse cambios en la molécula de hemoglobina, ya que el efecto estabilizador habrá cesado. Por otra parte, la capacidad para captar y ceder protones, convierte a



las proteínas y aminoácidos (presentes en la molécula de Hb) en amortiguadoras del pH por lo que actuarán como ácidos si están protonados o como bases si no lo están. Así mismo, cuando los aminoácidos se unen formando péptidos mediante enlaces entre los grupos -COOH de un aminoácido y el -NH₂ de otro, desaparecen sus propiedades amortiguadoras,¹⁴⁻¹⁶ todo lo que indica que es posible que la parte proteica que contiene la molécula de Hb, a una concentración determinada de ácido en la disolución, pueda llegar a neutralizar las propiedades estabilizadoras del medio al desnaturalizarse, lo que pudiera explicar las interferencias presentadas en la técnica de determinación de la Hb y la sobreexpresión de las concentraciones a pH < 4,0.

El análisis estadístico para la Hb liofilizada mostró que no existían diferencias significativas intragrupo para los grupos a pH desde 4,0 a 6,2, pero sí existían entre estos grupos y los de pH 2 y 3 y existían diferencias significativas intragrupo para los correspondientes a pH 2 y 3 para una $p \leq 0,05$ y un 95% de confianza (Figura 1).

Las concentraciones de Hb calculadas de los tres lotes de Hb obtenida a partir de sangre bovina, acidificados desde pH 2,0 hasta 5,0; revelaron que la concentración de Hb permanece sin diferencias significativas desde pH 5,0 hasta pH 4,0; intervalo por debajo del cual incrementa notablemente y se aleja bastante del valor inicial, sin acidificación, a pH 6,2 (Figura 2) al igual que ocurre con la Hb bovina liofilizada utilizada anteriormente.

Los resultados de un ajuste de pH más preciso con diferencia de dos décimas a un intervalo seleccionado entre pH 3,2 y 5,0 de acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento anterior, confirman claramente el incremento que tiene lugar en la concentración de Hb a pH desde 3,8 hasta 3,2 (Figura 3).

Tanto en las disoluciones de Hb bovina liofilizada, como en las muestras de Hb a partir de sangre bovina, según Cameron IL y Fullerton GD¹², la Hb, posee capacidad estabilizadora a pH ligeramente bajos, por lo que de acuerdo con los resultados de sobreexpresión de las concentraciones de Hb por debajo de pH 4, sugiere que esta capacidad se agota¹⁴⁻¹⁶ a este pH y comienza la desnaturalización de la molécula de Hb al continuar acidificándola, con lo que quedan expuestos al medio otros componentes de ella que pudieran reaccionar con los componentes del reactivo para la determinación de Hb en el medio y ser los responsables de los resultados de sobreexpresión de la concentración de Hb.

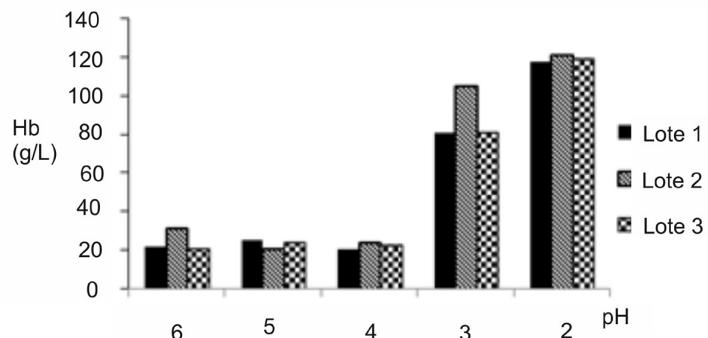
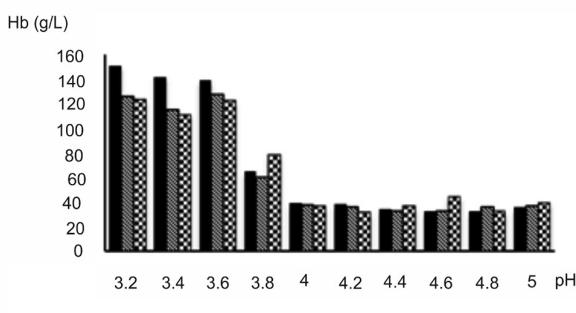
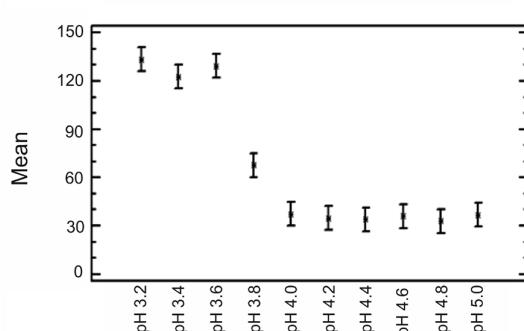


Fig. 2 Comportamiento de la Hb bovina acidificada de pH (2 a 6).



Means and 95,0 Percent LSD Intervals



El análisis estadístico para el intervalo de pH entre 3,2 y 5 de las disoluciones de Hb estudiadas mostró que los grupos de pH 3,2 a 3,8 presentaban diferencias significativas en relación con los grupos de pH 4 a 5, todos con un nivel de confianza del 95% para $p \leq 0,05$; mientras que no presentaban diferencias significativas intragrupo respectivamente. Solo existían diferencias en el grupo a pH 3,8 con respecto a su propio grupo (Figura 3).

CONCLUSIONES

Se demostró que la Hb liofilizada (patrón de trabajo), determinó con exactitud los resultados de concentración calculada con respecto a la concentración esperada de acuerdo con la concentración referida por el fabricante para la concentración preparada al 5 %.

Se pudo comprobar que el incremento de la concentración de Hb ocurre tanto en el patrón de Hb de elevada pureza utilizado como en las disoluciones de Hb con elevadas concentraciones de proteínas y fosfolípidos procedentes de la membrana celular del eritrocito, lo que señala que la presencia de estos elementos no constituye la causa esencial por la que la técnica modifica su comportamiento.

Los resultados relacionados con la concentración de Hb a pH entre 4 y 6, demuestran que la técnica de Drabkin puede ser utilizada desde pH 7,2 que es lo recomendado por el fabricante, hasta pH 4,0, lo que amplía bastante el intervalo de trabajo para diversos tipos de muestras experimentales de sangre, utilizadas en los laboratorios de concentraciones de Hb no menores al 5 %, como la que fue utilizada en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henry RF; et al. Principles and techniques in Clinical Chemistry. 2nd Ed. Harper and Row, Hurgestown, MD: Editorial 1974:1128-1135.
2. Drabkin DL, Austin JM. Spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chem.* 1932; 98(2):719-733.
3. Hiromi S, Shinji T and Hiroaki Y. Purification of concentrated haemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein expression and purification.* 1993;4:563-569.
4. Andrade CT, Barros LAM, Lima MCP, Azero EG. Purification and characterization of human haemoglobin effect of the haemolysis conditions. *Int J of Biological Molecules.* 2004;34: 233-240.
5. Kolb E. Fisiología Veterinaria. 1^{ra}Ed. Acribia. Capítulo VI. España: 1971:p.402.
6. USAL (Universidad de salamanca). Hemoproteínas: Hemoglobina y Mioglobina. Disponible en: www://USAL.es. Acceso el 17 Febrero de 2011.
7. Meneses I, Mosquera C, Silva RE. Análisis estructural de la hemoglobina. Disponible en: <http://Monografías.com>. Acceso el 18 Noviembre de 2010.
8. González Hernández R, Aznar García E, González Pérez M. Composición físico-química del antianémico y reconstituyente Trofin. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2004; abril-junio 36;(2):25-29.
9. Díaz de Armas M. et. al. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Rev. Cubana de Farmacia.* 1988; 32(2):106-12.
10. ICSH. Recommendations for reference method for haemoglobulinometry in human blood. (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation. 4^{ta} Ed. *J.Cli.Pathol.* 1996;49:271-274.
11. Zijlstra NC. Hematological assay methods. *Clin Chim Acta.* 1960; 5:719-721.
12. Cameron IL and Fullerton GD. A model to explain, the osmotic pressure behavior of hemoglobin and serum albumin. *Biochem Cell Biol.* 1990;68: 894-898.
13. Túnez Fiaña I, Galván Cejudo A, Fernández Reyes E. pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquímica-biol-mol/pdfs>. Acceso el 4 Abril de 2012.
14. Wikipedia. Enciclopedia Libre. Tampón químico. Disponible en: <http://es.wikipedia.org>. Acceso el 3 de Abril de 2012.
15. Esteche Fonseca M A, Reina Artucho M C. Trastornos metabólicos del equilibrio ácido-base. Disponible en: <http://tratado.uninet.edu/c050101.html>. Acceso el 3 Abril de 2012.
16. Casiday R and Frey R. Blood, sweat and buffers: pH regulations during exercise. Disponible en: <http://www.chemistry.wustl.edu>. Acceso el 4 Abril 2012.