

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE BIURET PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS TOTALES EN SUERO ANTIBOTRÓPICO POLIVALENTE PRODUCIDO EN EL CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS DEL INS

Flor Fuentes Paredes¹; Iván Quispe Díaz^{2a}; Jorge García Baltazar²

¹ Químico farmacéutico, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Productos Biológicos

² Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Productos Biológicos

RESUMEN

El presente estudio pretende estandarizar el método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópicos polivalentes. Se estudiaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación. El valor del coeficiente de correlación (0,996 tanto para linealidad del método y del sistema); coeficiente de determinación (0,992 y 0,993 para linealidad del sistema y del método respectivamente). La recuperación lograda en los tres niveles trabajados (98,86%), la recuperación por niveles (99,73; 97,51 y 99,34%). El coeficiente de variación de la precisión del sistema (4,51), nos señala una falta de precisión a este nivel. Sin embargo, respecto a la precisión del método un coeficiente de variación en los tres niveles trabajados (2,81) y por cada nivel (3,69, 3,38 y 1,55), por debajo del valor especificado nos demuestra una concordancia de los resultados.

Palabras clave: *Biuret; estandarización; Suero antibotrópico; Proteínas.*

ABSTRACT

This work is a pilot who tries to standardize the biuret method to quantify total protein in serum antibotrópicos versatile. We studied the following parameters: Linearity, accuracy, precision, limit of detection and quantification. The value of correlation coefficient (0,996 to linearity system and linearity method), coefficient of determination (0,992 and 0,993 to linearity system and linearity method) and statistical tests at (r,

b y a) indicate that method is linear. The recovery achieved in the nine working standards (98.86%), the recovery levels (99.73, 97.51 y 99.34%), and statistical tests show that the method is accurate. The coefficient of variation of repeatability of the wing system (4.51), we noted a lack of precision at this level but regarding the repeatability of the method a coefficient of variation at all three levels worked (2.81) and for each level (3.69, 3.38 and 1.55), below the specified value has shown a consistency of results. The detection limit and quantification allows us to have a precedent it could detect and quantify the method under study.

Key words: *Biuret, standardization, antithropic serum proteins.*

INTRODUCCIÓN

El ofidismo constituye un importante problema de salud en las áreas rurales de la costa y selva peruana. En el Perú, el ofidismo constituye la primera causa de envenenamientos fatales producidos por animales ponzoñosos cada año; su terapéutica se basa, desde algunas décadas atrás, en el empleo de los sueros hiperinmunes producidos en equinos ^(1,2).

Las serpientes venenosas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* son endémicas en la Amazonía peruana. La *B. atrox* es la serpiente cuya mordedura (botropismo) tiene la mayor prevalencia a nivel nacional. El botropismo es más frecuente en varones, y un tercio de los pacientes suelen ser niños ⁽²⁾.

El Instituto Nacional de Salud a través del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB), dentro de la gama de productos que produce tiene al suero antibotrópico polivalente, producido a partir de inmunoglobulinas equinas.

Una de las preocupaciones estratégicas más relevantes del CNPB, ha sido, es y será, el logro de niveles de calidad aceptable y adecuada a su gestión. Uno de los bloques fundamentales de la ventaja competitiva es el logro de un nivel de calidad superior ⁽³⁻⁵⁾.

En la elaboración de productos biológicos, así como en la de otros productos relacionados con el campo de la salud, es indispensable realizar una inspección completa al proceso de la producción aplicando normas establecidas a fin de garantizar al consumidor que los productos que recibe sean los óptimos ⁽⁶⁻⁸⁾.

La presente investigación pretende estandarizar el método de detección de proteínas totales en el suero antibotrópico polivalente, solución inyectable, que se analiza en el Laboratorio de Control de Calidad del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) del Instituto Nacional de Salud por el método de Biuret, el cual consiste en que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionen con los iones de cobre (Cu^{2+}) en solución alcalina para formar un producto coloreado cuya absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas en el suero antibotrópico y así cumpla con la especificación de contenido de proteínas definidas, el cual pueda contribuir posteriormente a la validación del método de ensayo.

El objetivo general fue estandarizar el método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente producidos en el Centro Nacional de Productos Biológicos del INS

Los objetivos específicos son: demostrar que el método de Biuret, cumple con los parámetros de desempeño analítico propuestos, optimizar y normalizar la utilización de reactivos, equipos y metodologías.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra

Veinte unidades de suero antibotrópico polivalente, almacenados a temperatura de 2 - 8 °C.

Equipos

Balanza analítica, espectrofotómetro UV/VIS, purificador de agua, estufa, micropipeta P-100.

Reactivos

Hidróxido de sodio, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, sulfato de cobre pentahidratado, ioduro de potasio, agua purificada, estándar de albúmina bovina sérica fracción V.

MÉTODOS ⁽⁹⁻¹¹⁾

Recolección de la muestra

Se seleccionó al azar veinte unidades de suero antibotrópico polivalente, correspondiente al lote 00300117. Con fecha de expiración marzo 2010 y almacenados a temperatura de 2-8 °C.

Experimentos realizados en la estandarización

En el estudio de la linealidad del sistema se pesó exactamente 206; 412; 618; 824; 1030 y 1236 mg (25, 50, 75, 100, 125 y 150%), de estándar de albúmina bovina sérica; se agregó un volumen de agua purificada. De esta mezcla se extrajo 100 μL y se colocó en un tubo de vidrio; se agregó 5 mL del reactivo Biuret, se agitó suavemente durante 30 s; luego se selló con *parafilm* y se dejó reposar por 25 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 540 nm. Se realizó por triplicado.

En el estudio de la linealidad del método, se pesó exactamente 659,2; 824 y 988,8 mg (80, 100 y 120 % respectivamente), de estándar de

albúmina bovina sérica y se llevó a fiola de vidrio ámbar de 10 mL. Se agregó un volumen de agua purificada. De la mezcla se extrajo 100 uL y se colocó en un tubo de vidrio; se agregó 5 mL del reactivo Biuret, se agitó suavemente durante 30 segundos tratando de homogenizar por completo; luego se selló con *parafilm* y se dejó reposar por 25 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 540 nm. Se realizó por triplicado.

En el estudio de la exactitud se trabajó con los mismos espectros obtenidos en la linealidad del método, con tres concentraciones de 80, 100 y 120%.

El estudio de repetibilidad del sistema se efectuó midiendo diez veces la solución estándar de albúmina bovina sérica al 100%.

En el estudio de repetibilidad del método se trabajó con los mismos espectros obtenidos en la linealidad del método, con tres concentraciones de 80, 100 y 120%.

En el estudio del límite de detección y cuantificación, se usaron las formulas de los Anexos.

Análisis de resultados ^(4,12)

Se analizó estadísticamente con la ayuda del programa EXCEL 2003 para Windows.

RESULTADOS

Tabla 1. Linealidad del método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente.

Variabes	Linealidad del método	Linealidad del sistema
Coefficiente de correlación	0,996	0,996
Coefficiente de determinación	0,993	0,992
Coefficiente de variación	5,23	3,98

Tabla 2. Exactitud del método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente.

Concentración (g%)	Hallado (g%)		Porcentaje recuperado	
	Individual	Promedio	Individual	Promedio
6,4	6,65		103,9	
6,4	6,3	6,38	98,43	99,73
6,4	6,2		96,88	
8,0	7,6		95,00	
8,0	7,7	7,80	96,30	97,51
8,0	8,1		101,25	
9,6	9,7		101,04	
9,6	9,5	9,54	98,96	99,34
9,6	9,41		98,02	

Tabla 3. Precisión del sistema del método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente.

Variabes	Concentración 8%
Coefficiente de variación	4,51

Tabla 4. Precisión del método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente.

Variabes	Concentración g%		
	6,4	8	9,6
Coefficiente de variación	3,69	3,38	1,55

Tabla 5. Límite de detección y cuantificación del método de Biuret para cuantificar proteínas totales en sueros antibotrópico polivalente.

Estudio	b	Sbl	k	kSbl/b
Límite detección	0,0462	0,0015	3	1 mg/mL
Límite cuantificación	0,0462	0,0015	10	3 mg/mL

DISCUSIÓN

El método de Biuret utilizado para cuantificar proteínas totales en suero antibotrópico polivalente por espectrofotometría de UV/VIS, es un método propio del laboratorio que no se encuentra reportada en farmacopeas oficiales, por lo que debe estandarizarse previa a su validación, para proporcionar un alto grado de confianza, seguridad y calidad de resultados, lo cual se traduce en disminución de errores y repeticiones del análisis ^(3,10).

La Tabla 1, muestra el análisis de la linealidad, mediante la determinación del coeficiente de correlación de 0,996 (indicaría que existe correlación lineal), coeficiente de determinación 0,992 y 0,993 (variaciones se debe a la influencia de la variable "X") y coeficiente de variación 5,23 y 3,98 (expresando solo linealidad para el sistema) ⁽¹³⁻¹⁶⁾.

En la Tabla 2 se muestra el análisis de la exactitud; al evaluar este parámetro se obtiene un porcentaje de recuperación media mayor al 97 %, siendo esta adecuada ya que está dentro del rango establecido para métodos espectrofotométricos (97-103%) ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Un estudio desarrollado por la Universidad de la Amazonía encontró que los porcentajes de recuperación de proteína estuvieron entre el 61,8 a 90,83% cuando se adiciono un 20% más de estándar a las muestras, y entre 73,64 a 87,98% cuando se adicionó un 80% de albumina sérica bovina (BSA) ⁽²⁰⁾.

En la Tabla 3 se muestra el análisis de la precisión del sistema, se obtuvo un coeficiente de variación de 4,51%, el cual está por encima del valor máximo permitido 2,0%. Esta inconformidad puede mejorarse a medida que el analista trabaje constantemente para obtener datos con una mejor homogeneidad.

Las condiciones operativas y ambientales diferentes que pueden influir son: humedad,

temperatura ambiental, analista con diferentes experiencias, instrumentos de características diferentes, variaciones de condiciones instrumentales y reactivas de diferente calidad ^{21, 22}.

En la Tabla 4 se muestra el análisis de la precisión del método, obteniendo un coeficiente de variación de 2,81% el cual está dentro del parámetro establecido, 5%. Esto se comprueba una adecuada variabilidad del método analítico al efectuar una serie de análisis con la misma muestra, en las mismas condiciones operativas (el mismo analista, aparato y reactivos), en un mismo laboratorio y en un periodo corto.

El proceso que puede influir en la precisión del método es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. La precisión del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra, es decir, cuanto sea mayor la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad aumente ²³.

En la Tabla 5 se muestra el análisis del límite de detección y cuantificación (1 y 3mg/mL respectivamente), vale recalcar que se debería seguir trabajando en estos parámetros hasta obtener resultados que le brinden una mayor certeza.

Un estudio desarrollado por la Universidad de la Amazonía, en cuanto al método de Biuret, encontró un límite de detección de 0,020 mg/mL de proteína, (expresado como albumina sérica bovina, BSA). Un límite de cuantificación de 1,33 mg/mL de BSA en solución salina al 0,9% ⁽²⁰⁾.

CONCLUSIONES

Del estudio piloto para estandarizar el método de Biuret para cuantificar proteínas totales en el suero antibotrópico polivalente producido en el Centro Nacional de Productos biológicos (CNPB) se llego a la siguiente conclusión.

- El método en mención cumple con los parámetros de desempeño analítico propuestos respecto a linealidad del sistema y método (2-12g% y 6,4 - 9,6 g% respectivamente), exactitud y precisión del método (en el rango 6,4–9,6 g%), límite de detección y cuantificación (en el rango 1mg/mL y 3 mg/mL respectivamente).
- El presente estudio es paso previo a seguir para validar el método analítico, cuantificación de proteínas totales en el suero antitropical polivalente solución inyectable que se analiza en el laboratorio de control de calidad del CNPB durante el proceso de fabricación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De la Vega E, Zavaleta A, Carrillo N, Trelles L. Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú. EN: Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Programa Nacional de Control de Zoonosis, Ministerio de Salud. Lima, Ceres Editora; 1989. p 169-88.
2. Zavaleta A, Álvarez H. Envenenamiento por mordedura de serpientes. En: Urgencias en Medicina Interna. Lima ED Morales Soto, R-Talleres Gráficos P.L. Villanueva; 1990. Vol 2. p. 427-40.
3. Zavaleta A, Campos SM. Producción de veneno cristalizado de serpiente en el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú): periodo 1970-1986. Rev Med Hered 1992; 3. (Suppl 1):87.
4. Zavaleta A, Campos SM. Estimación de la cantidad individual de veneno producida por serpientes venenosas peruanas. Rev Med Hered. 1992;3 (Suppl 1):90.
5. Zavaleta A, Salas M, Villegas L. Seroneutralización paraespecífica del veneno de Bothrops atrox por sueros antiofídicos argentinos. Rev Med Hered. 1992;3. (Suppl 1):87.
6. Castro M, Col. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Sección Catalana. España;1996.
7. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Manual de buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Lima; Ministerio de Salud; 1999.
8. Benítez E. Buenas Prácticas de Manufactura. 1º ed. Madrid ED Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica;1996.
9. United States Pharmacopeia XXXI. Convention-INC-Validation of compendial methods. ED Printed by National Publishing. 2009. p. 2432.
10. Chang CH. Analytical method validation and instrument performance varification. 1º ed. Canada; ED John Wiley & Sons. 2004. p 11-26.
11. Somenath M. Sample preparation techniques in analytical chemistry. 1º ed. Canada; ED John Wiley & Sons. 2003. p 1-17.
12. Steel R, Torrie J. Bioestadística y Procedimientos. 2º ed. Colombia; ED Mc Graw Hill Interamericana: 1985. p. 132-36; 495-99.
13. Joachim J, Miller H. Method validation in pharmaceutical analysis. Ac guide to best practice. 1º ed. Germany; ED Wiley-VCH. 2005. p 21-120.
14. Dietmar K. Desarrollo y validación de métodos analíticos. <http://www.Laus.de/es/leistungen/analytischechemie/methodenentwicklung/lung-validierung/index.html> [Consultado: julio 2009]
15. Validation of Standard Methods. Analytical Validation Supplement to Pharmaceutical Technology. 1998. p 6-8. <http://www.labcompliance.com/conferences/a280.htm>. [Consultado: julio 2009]
16. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona. 2001. p23-28, 43, 56, 68, 76.
17. Validation of Analytical Procedures. Methodology Q2B. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human us. Noviembre 1996. http://www.ich.org/MediaServer.jsr?@_ID=418&@_MODE=GLB [Consultado: agosto 2009]
18. Sare C. Validación del método del arsenomolibdato para cuantificar arsénico en agua. Tesis para optar el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica Lima, Perú; 2007. p 18-25.
19. Flores J. Validación concurrente del Proceso de Fabricación de Tabletas Recubiertas de Amoxicilina 500 mg. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2002. p 4-6.
20. Murillo J, Ferney E. Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia viperidae bothrops atrox mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonia. Tesis para optar el Título de Biólogo. Universidad de la Amazonia. 2009. p 33-34.
21. Morales, C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica para cromatografía líquida de alta performance (HPLC), para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Peru 2004. p 10-50.
22. Validation of Analytical Methods. Review and Strategy. 1998. p 96-105. <http://www.labcompliance.com/conferences/a280.htm>. [Consultado: agosto 2009]
23. Eurachem on Method Validation. Validation of Methods Analytical. <http://www.eurachem.bam.de/guides/mval.htm>. [Consultado: agosto 2009]