

INTERFERENCIA DE HEPARINA EN LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Cabanillas, Laura Marina; da Silva, María Ángel; Marinsaldi, Anabella; Bernardi, María Eugenia.

Área de Desarrollo de Productos y Procesos, Laboratorio de Hemoderivados (LH), Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Córdoba, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La determinación de proteínas totales (PT) es una técnica de rutina en la industria biofarmacéutica y la elección del método analítico es clave para la obtención de resultados confiables. En este sentido, el método de Bradford es ampliamente utilizado por ser rápido, de bajo costo y con sensibilidad satisfactoria.

En este trabajo se evaluó la interferencia de Heparina (Hep) en la cuantificación de PT por el método de Bradford, ya que dicha sustancia es comúnmente utilizada como excipiente en la formulación de Concentrados de Factores de la Coagulación (CFC). Además, se estudió el agregado de Polybrene (Poly), agente neutralizante de Hep, previo a la cuantificación de PT y, como método alternativo de referencia, se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA). La concentración de PT y la concentración de Hep son requisitos regulatorios en CFC, por lo tanto, su correcta cuantificación es relevante.

DESARROLLO

Se aplicó el método de Bradford utilizando como estándar Albúmina Sérica Bovina (BSA) 7 g% (NIST).

El método del BCA fue adaptado a microplaca utilizando el kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific™).

Se evaluó la interferencia de Hep analizando soluciones de BSA 40 mg% conteniendo Hep (0,8 a 24,0 UI/ml). Para evaluar la neutralización de Hep, se analizaron soluciones de BSA 40 mg% conteniendo Hep en diferentes concentraciones neutralizadas previamente con Poly.

Además, se determinó la concentración de PT en muestras de CFC, con y sin Hep, neutralizando o no con Poly, por el método de Bradford y por BCA.

La interferencia se evaluó calculando el porcentaje de recuperación (R%) de cada condición analizada tomando como 100 % el valor de PT de BSA 40 mg% sin ningún agregado. Criterio de aceptación: $R\% = 100 \pm 15\%$. Se aplicó t-student ($\alpha 0.05$) para el análisis estadístico.

RESULTADOS

A concentraciones menores de 1,6 UI/ml de Hep, no se detectó interferencia en la determinación de PT, mientras que a partir de 2,4 UI/ml, se observó una interferencia por defecto en los resultados de PT, siendo resultados estadísticamente diferentes a la muestra sin Hep. En cuanto a la neutralización de la Hep con Poly, antes de la determinación de PT por Bradford, se pudo observar que el efecto interferente se revirtió completamente en soluciones de BSA mientras que en las muestras de CFC, la neutralización no fue efectiva.

CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron que la Hep interfiere en la cuantificación de PT por el método de Bradford, subestimando la concentración de PT siendo dicha interferencia concentración-dependiente. Dicho fenómeno podría deberse a una interacción de la Hep con los aminoácidos de las proteínas impidiendo la unión al colorante utilizado en Bradford.

Sobre la neutralización con Poly previo a la aplicación del método, se recomienda la evaluación de cada caso particular o elegir un método alternativo donde la Hep no sea un interferente, como el método del BCA.

La obtención de resultados confiables de Hep y de PT son de relevancia para cumplir con los requisitos de calidad de los CFC.