

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA Y BOVINA POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

**JENNY CAROLINA ESPINOSA CALDERÓN
ÁNGELA BONILLA CASTRO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA Y MOLECULAR (LEAM)
BUCARAMANGA
2011**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA Y BOVINA POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

**JENNY CAROLINA ESPINOSA CALDERÓN
ÁNGELA BONILLA CASTRO**

**Trabajo de grado para optar al título de
QUIMICO**

**DIRECTOR:
ENRIQUE MEJIA OSPINO
Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA Y MOLECULAR (LEAM)
BUCARAMANGA
2011**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. CONSIDERACIONES TEORICAS	15
1.1 ALBUMINA SERICA	15
1.1.1 Generalidades.	15
1.1.2 Albumina sérica humana.	16
1.1.3 Albumina sérica bovina.	17
1.1.4 Métodos actuales de cuantificación de albumina.	17
1.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	19
1.2.1 Fenómeno de fluorescencia.	19
1.2.2 Espectroscopia de Fluorescencia sincrónica (SFS).	20
1.2.3 Espectrofluorímetro.	22
1.2.4 Marcadores Fluorescentes.	23
1.2.5 Variables que afectan la fluorescencia	26
2. PARTE EXPERIMENTAL	28
2.1 MUESTRAS	28
2.1.1 Tratamiento de muestras.	29
2.2 ULTRAVIOLETA/VISIBLE	30
2.2.1 Instrumentación.	31
2.2.2 Adquisición de espectros UV/Vis	31
2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	32
2.3.1 Instrumentación.	32
2.3.3 Establecimiento de parámetros	34
2.4 ANALISIS DE LOS ESPECTROS OBTENIDOS	35
3. RESULTADOS Y ANALISIS	37
3.1 DISPERSIÓN RAMAN DEL AGUA	37
3.2 FLUORESCENCIA DE BSA	38
3.3 FLUORESCENCIA SINCRÓNICA DE BSA	44

3.4 FLUORESCENCIA DE BSA MARCADA CON SRB	48
3.5 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS OBTENIDOS A MUESTRAS DE HSA	52
3.5.1 Fluorescencia de HSA.	53
3.5.2 Fluorescencia Sincrónica de HSA.	54
3.5.3 Fluorescencia de SRB apagada con HSA.	56
4. CONCLUSIONES	59
5. RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura cristalina de la BSA y la ubicación de sitios de unión.	15
Figura 2. Diagrama de Jablonski.	21
Figura 3. Estructura molecular de SRB	26
Figura 4. Espectro absorbancia de patrón de BSA 3×10^{-5} M	31
Figura 5. Espectro de absorbancia de patrón de SRB 1×10^{-6} M	32
Figura 6. Espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40.	34
Figura 7. Espectro de la Dispersión Raman del Agua	37
Figura 8. Espectro de Fluorescencia del patrón de BSA 3×10^{-7} M	38
Figura 9. Espectro de excitación de BSA 3×10^{-5} M	39
Figura 10. Espectro de fluorescencia del Trp 1×10^{-5} M	39
Figura 11. Espectros de fluorescencia de diferentes patrones de BSA	40
Figura 12. Curva de calibración para la determinación de BSA y HSA empleando fluorescencia	42
Figura 13. Espectros de fluorescencia sincrónica de diferentes patrones de BSA	45
Figura 14. Curva de calibración para la determinación de BSA y HSA empleando fluorescencia sincrónica	47
Figura 15. Espectros de fluorescencia de SRB apagada con BSA	49
Figura 16. Grafica de Stern-Volmer para el apagamiento de SRB con BSA	51
Figura 17. Espectros de fluorescencia de muestras de HSA	53
Figura 18. Espectros de fluorescencia Sincrónica de muestras de HSA	55
Figura 19. Espectros de SRB apagada por diferentes muestras de HSA	56

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Determinación de HSA con Poncean S a pH 3.6	18
Tabla 2. Parámetros de fluorescencia de aminoácidos aromáticos en agua a pH neutro	23
Tabla 3. Parámetros para la obtención espectros de excitación y fluorescencia	35
Tabla 4. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia de BSA	41
Tabla 5. Parámetros analíticos para BSA y HSA empleando fluorescencia	43
Tabla 6. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia sincrónica de BSA	45
Tabla 7. Parámetros analíticos para BSA y HSA empleando fluorescencia sincrónica	47
Tabla 8. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia de SRB apagada con BSA	50
Tabla 9. Cuantificación de HSA sin marcar empleando fluorescencia	54
Tabla 10. Cuantificación de HSA sin marcar empleando fluorescencia Sincrónica	55
Tabla 11. Cuantificación de HSA marcada con SRB empleando fluorescencia	57

RESUMEN

TITULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA Y BOVINA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA **

AUTORES

JENNY CAROLINA ESPINOZA CALDERÓN**
ÁNGELA BONILLA CASTRO**

PALABRAS CLAVES

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA, FLUORESCENCIA SINCRÓNICA, ALBUMINA SÉRICA

DESCRIPCIÓN

Con el objetivo de cuantificar albumina sérica humana (HSA) y bovina (BSA) marcadas y sin marcar se realizaron una serie de ensayos, con el fin de evaluar la utilidad de la espectroscopia de fluorescencia y fluorescencia sincrónica, en la implementación de un método analítico para determinar la concentración de HSA y BSA en medios acuosos, de forma rápida, confiable y económica, análisis de gran importancia en el diagnóstico de enfermedades, así como para muchos otros propósitos. Se prepararon soluciones patrón de BSA por disolución de muestra en agua tipo I junto con los diferentes marcadores. La BSA fue analizada por espectroscopia de absorción UV-Vis, espectroscopia de emisión de fluorescencia y espectroscopia de fluorescencia sincrónica empleando distintas $\Delta\lambda$. Se realizaron curvas de calibración de BSA. La adquisición de espectros de absorción, fluorescencia y fluorescencia sincrónica se realizó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40.

Este método mostró una excelente exactitud, con un coeficiente de correlación de 0,988. Las desviaciones que se obtuvieron se encuentran por debajo del 5%; éstas se evaluaron mediante diluciones que involucraban el rango de trabajo de la curva estándar. El límite de detección fue de $5,076 \times 10^{-9}$ [mol/L] y el límite de cuantificación de $1,692 \times 10^{-8}$ [mol/L], parámetros que establecen la sensibilidad del método. Se cuantificó HSA en muestras de suero de siete pacientes sanos en exámenes de rutina como control, aleatoriamente seleccionados en la ciudad de Bucaramanga.

De acuerdo con los resultados, se puede afirmar que es posible hacer la cuantificación del contenido de albúmina sérica en distintos medios, utilizando espectroscopia de fluorescencia y fluorescencia sincrónica, mediante las cuales se elimina la interferencia, insensibilidad a la turbidez, ruido de fondo a concentraciones bajas de muestra y en las que no es necesario el uso de marcadores y tratamientos adicionales a la muestra después de su disolución.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino

SUMMARY

TITLE: IMPLEMENTATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMIN BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY*

AUTHORS

JENNY CAROLINA ESPINOSA CALDERÓN
ÁNGELA BONILLA CASTRO**

KEYWORDS

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, FLUORESCENCE SYNCHRONOUS, SERUM ALBUMIN.

DESCRIPTION

In order to quantify human serum albumin (HSA) and bovine (BSA) marked and unmarked, we have done a series of test to evaluate the usefulness of fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence in the implementation of an analytical method to determine the concentration of HSA and BSA in aqueous media. A fast, reliable and economical analysis is of very important in the diagnosis of diseases as well as for many other purposes. Standard solutions were prepared by dissolving BSA in water sample type I together with the marker. The BSA was analyzed by spectroscopy UV-Vis absorption, fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy using different $\Delta\lambda$. Calibration curves of BSA were obtained. HSA samples were subjected to the same treatment described for standards of BSA. The acquisition of absorption spectra, fluorescence and synchronous fluorescence was performed using a fluorescence spectrophotometer PTI/QM-40.

This method showed excellent accuracy, with a correlation coefficient of 0.988. The deviations that were obtained are below 5%, they were evaluated by dilution involving the working range of the calibration standard curve. The detection limit was $5,076 \times 10^{-9}$ [mol/L] and the limit of quantification of $1,692 \times 10^{-8}$ [mol/L]. HSA was quantified in serum samples of seven healthy patients, randomly selected in the city of Bucaramanga.

According to the results, we can say that it is possible to quantify the serum albumin content in different media, using fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence, whereby interference is eliminated, insensitivity to turbidity, background noise levels low sample, which is not necessary to use markers and additional treatments to the sample after its dissolution.

* Work Degree

** Sciences Faculty. Chemistry School. Directress: Enrique Mejía Ospino

INTRODUCCIÓN

Las albúminas séricas son las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo, constituyendo el 52% de la composición de proteínas totales en esta matriz. ^[1] Debido a esto las albúminas poseen muchas funciones fisiológicas y desempeñan un papel clave en el transporte de muchos ligandos endógenos y exógenos. ^[2] La albúmina está presente tanto en suero humano como bovino.

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más usada en el mundo, debido a la forma en que estabiliza el volumen sanguíneo y evita el riesgo de infarto, esto hace que sea de vital importancia su presencia en los quirófanos. Niveles altos de albúmina pueden indicar deshidratación y niveles bajos de albúmina se asocian con sobrehidratación, cirrosis y otras enfermedades del hígado ^[3]

La principal razón por la que se emplea albúmina sérica bovina (BSA) en diferentes análisis como en la estimación de proteínas para trazar curvas estándar es debido a que es comercialmente fácil de adquirir y su costo es relativamente bajo. La BSA se ha seleccionado como proteína modelo en este trabajo debido a su importancia médica, su abundancia, bajo costo, inusuales propiedades de unión al marcador, estabilidad, y los resultados de todos los estudios son consistentes por el hecho de que la albúmina de suero humano y bovino son proteínas homólogas ^[4]

La determinación de la cantidad de proteína en líquidos biológicos es de gran importancia en biología y medicina. Se han reportado una serie de ensayos en los últimos años basados en espectroscopia de absorción, electroquímica y métodos de quimioluminiscencia. La mayoría de los análisis de proteínas utilizados son métodos espectroscópicos, sin embargo tienen algunas limitaciones en cuanto a sensibilidad, selectividad, estabilidad y simplicidad. ^[1]

Conocer los niveles de albúmina sérica permite evaluar estados nutricionales, presión oncótica de la sangre, enfermedades renales como proteinuria y otras enfermedades crónicas, para lo cual las medidas de fluorescencia ofrecen una gama mucho más amplia de posibilidades y por lo general se pueden llevar a cabo con solo pequeñas cantidades de proteína ^[3]

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual se excitan las moléculas por absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan a un estado de menor energía o estado fundamental, liberando su energía en forma de fotones. Una de las principales características de la fluorescencia es su alta sensibilidad. ^[5]

Uno de los modos en que se trabaja la espectroscopia de fluorescencia, es la denominada espectroscopia de fluorescencia sincrónica. En la espectroscopia de fluorescencia sincrónica (SFS) la sensibilidad asociada con la fluorescencia se mantiene además que ofrece varias ventajas como son la simplificación del espectro, la reducción de ancho de banda espectral y evita diferentes interferencias. ^[1]

La fluorescencia es la técnica más adecuada para el estudio de proteínas debido a su sensibilidad inherente. ^[5,6] La espectroscopia de fluorescencia presenta diversas ventajas sobre la espectroscopia de absorción en este tipo de análisis; entre las cuales el reducido número de interferencias, bajas concentraciones de muestra, mayor sensibilidad ante cambios en el entorno e insensibilidad a la turbidez, hacen de esta técnica la mejor opción en un amplio campo de análisis. ^[6]

Evaluando las características tanto de la técnica como de la muestra, se implementó en este proyecto la técnica de fluorescencia y fluorescencia sincrónica para determinar la concentración de HSA y BSA en medio acuoso con y sin marcador (Sulforodamina B).

1. CONSIDERACIONES TEORICAS

1.1 ALBUMINA SERICA

1.1.1 Generalidades. La proteína más abundante del plasma sanguíneo es la albúmina, con una concentración normal en el plasma humano entre 35 y 50 g/L. [3] Las concentraciones bajas de esta proteína se presentan en personas que padecen malnutrición, inflamación y enfermedades graves del hígado y del riñón. La albumina es fundamental para el mantenimiento de la presión osmótica sanguínea, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimiento intravascular y extravascular, controlando de esta manera la tendencia a difundirse a través de las paredes de los vasos sanguíneos. [2] La albumina tiene carga eléctrica negativa, posee un pK de 8.5, un pH de 8.0 y un punto isoeléctrico en agua a 25°C de 4.7

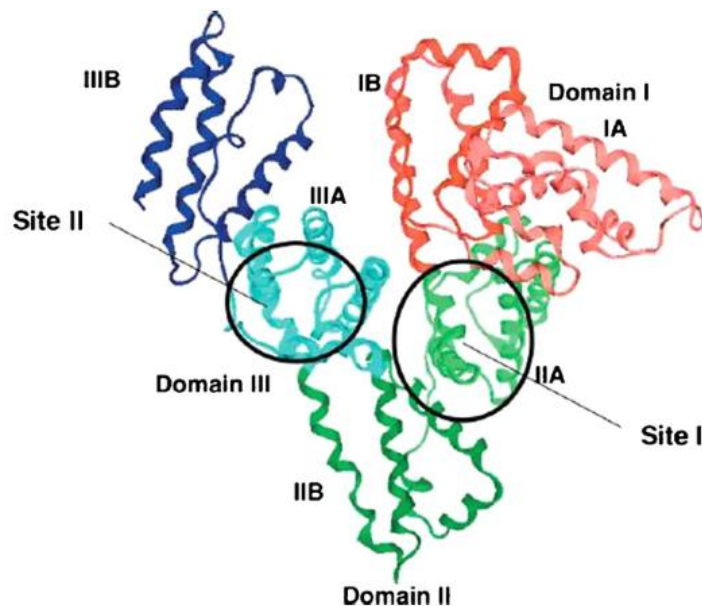


Figura 1. Estructura cristalina de la BSA y la ubicación de sitios de unión. Se muestra la ubicación de los sitios de unión hidrofóbica (sitio I y II). Fuente: Huai-Hong Cai. Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin

La albúmina sérica humana (HSA) y la albúmina sérica bovina (BSA) son proteínas homologas. Esta proteína se compone de 585 aminoácidos en una cadena polipeptídica única y tiene un peso molecular de 66.500 Da. [7] Su estructura globular está compuesta por tres dominios homólogos principales (Dominios I-III), unidos por fuerzas físicas y seis subdominios (A y B) que están envueltos por puentes disulfuro. La albúmina sérica contiene 17 puentes disulfuro y un grupo SH libre, lo que facilita la dimerización y también influye en asociaciones de orden superior. [7, 8]

El análisis de la estructura cristalina de la albumina sérica indica que la unión específica de los ligandos de la proteína se origina en los dos sitios principales y estructuralmente sitios de enlace selectivos, es decir, el sitio I y el sitio II, que se encuentran en las cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA, respectivamente (Figura 1). La afinidad de unión que se origina en el sitio I es principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, mientras que las uniones en el sitio II consisten en enlaces del hidrogeno hidrofóbico e interacciones electrostáticas. [2]

1.1.2 Albumina sérica humana. La albúmina sérica humana es el principal componente proteínico del plasma sanguíneo pero también está presente en el líquido intersticial de los tejidos corporales. Esta proteína se sintetiza en el hígado y tiene una vida media de diecinueve días en la circulación. Carter, D. C. y J. X. Ho en 1994 informaron que la albúmina también es uno de los principales responsables para el mantenimiento del pH en la sangre, además que contribuye en la regulación de la presión oncótica. [9,10]

HSA se denomina como una proteína plasmática multifuncional debido a su capacidad de ligar un amplio espectro inusual de ligandos. Estos incluyen cationes inorgánicos, aniones orgánicos, diversos fármacos, aminoácidos y quizás los más importantes, compuestos fisiológicamente insolubles endógenos como la

bilirrubina, ácidos grasos y ácidos biliares. ^[9] Casi todos los aminoácidos hidrofóbicos de la HSA forman cavidades hidrofóbicas que juegan un papel importante en el transporte de medicamentos.

1.1.3 Albumina sérica bovina. La albumina sérica bovina (BSA) es una proteína que posee numerosas aplicaciones bioquímicas incluyendo ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunotransferencias y en inmunohistoquímica. ^[5] También es usada como nutriente en cultivos celulares y microbianos. En análisis de restricción, BSA se utiliza para estabilizar algunas enzimas durante la digestión del ADN y para impedir la adherencia de la enzima en los tubos de reacción. BSA también es utilizada comúnmente para determinar la cantidad de otras proteínas, mediante la comparación de una cantidad desconocida de la proteína con cantidades conocidas de BSA. La BSA es empleada debido a su estabilidad, a su falta de efecto en reacciones bioquímicas, y su bajo costo, ya que grandes cantidades de esta proteína pueden ser fácilmente purificadas de la sangre bovina, un subproducto de la industria ganadera. ^[11]

1.1.4 Métodos actuales de cuantificación de albumina. Tres métodos son comúnmente usados para cuantificar las proteínas en medios biológicos, el primer método para la cuantificación fue desarrollado en 1951, por Lowry. En 1976, Bradford desarrollo un ensayo colorimétrico más sensible, usado actualmente, puesto que permite sensibilidad y simplicidad. Sin embargo los ensayos de Bradford aunque fáciles y relativamente cuantitativos han sido reemplazados con el fin de obtener mayor precisión en las medidas de concentración usando una aproximación espectrofotométrica. Estas mediciones se realizan basadas en la absorbancia de la proteína en el ultravioleta a 280nm. Los aminoácidos, triptófano y tirosina, y una pequeña contribución de la cisteína son principalmente los responsables de la absorbancia. Se obtiene una mayor precisión con este método, si se conoce la composición en aminoácidos de la proteína. ^[12, 13]

Se han realizado diferentes estudios para la cuantificación de HSA, Hong-Wen Gao y colaboradores ^[9] utilizaron colorimetría con azul de Coomassie para cuantificar HSA con Poncean S a pH 3.6 en muestras de sangre humana, suero de pollos y anguilas, clara de huevo de codorniz y leche. Poncean S es un compuesto Azo utilizado como aditivo en cosméticos o como marcador biológico generalmente muy eficaz, ya que puede entrar en el tracto gastrointestinal a través de los alimentos o filtrarse en la sangre a través de la absorción de la piel. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1. Pero el inconveniente de este método es la precisión y confiabilidad de los resultados. ^[9]

Tabla 1. Determinación de HSA con Poncean S a pH 3.6

Muestra*	HSA adicionada, µg	Proteína encontrada, µg	Contenido de proteína en la muestra, mg/ml
Clara de huevo de codorniz	0	38.7±1.7	38.7
	10	50.7, 48.4	
Leche	0	58.3±0.6	58.3
	10	69.8, 67.8	
Suero Humano	0	20.1±1.5	20.1
	10	31.2, 30.6	
Suero de Pollo	0	37.1±1.4	37.1
	10	56.8, 57.7	
Suero de Anguila	0	11.9±2.4	11.9
	10	20.9, 22.3	

* 0.100mL de la solución diluida de la muestra fueron adicionados

Dong-Hui Li, Huang-Hao Yang, Hong Zhen, Ying Fang, Qing-Zhi Zhu y Jin-Gou Xu en 1999 ^[14] introducen un nuevo método basado en “Quenching” (Apagamiento) de fluorescencia para la determinación continua de albúmina en suero humano empleando como colorante fluorescente ftalocianina de aluminio sulfonada tetrasustituida (AIS₄Pc). La albúmina se determinó en forma selectiva a pH 3, los factores que influyeron en las medidas fueron la acidez del medio, el tiempo de

reacción, la interferencia de sustancias no proteicas, así como la desnaturalización de la proteína. Bajo condiciones optimas se construyó una curva de calibración cuyo rango lineal fue de 0,1-4,0 mg/ml de albúmina y el límite de detección fue de 0,04 mg/ml. ^[14] Este método fue aplicado posteriormente en análisis de muestras de suero recogidas de hospitales y los resultados fueron concordantes comparados con los datos reportados por el hospital, lo que indica que el método presentado no es solo sensible y sencillo, sino también confiable y adecuado para las aplicaciones prácticas, pero afecta la estabilidad del método debido a que se produce desnaturalización de la proteína. ^[14]

1.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

1.2.1 Fenómeno de fluorescencia. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. ^[5]

La primera observación de fluorescencia de una solución de quinina a la luz del sol se informó por sir John Frederick Guillermo Herschel en 1845. La quinina en agua tónica cuando es excitada por la luz ultravioleta del sol, a su regreso al estado fundamental emite luz azul con una longitud de onda cerca de 450nm. ^[5]

Una característica importante de la detección por fluorescencia es su alta sensibilidad. La sensibilidad de la fluorescencia se utilizó en 1877 para demostrar que los ríos Danubio y Rin estaban conectados por ríos subterráneos. Esta conexión se demostró mediante la colocación de fluoresceína en el Danubio. Algunas horas más tarde, su sesenta por ciento de fluorescencia verde característica apareció en un pequeño río que desemboca en el río Rin. Hoy en día la fluoresceína todavía se utiliza como un marcador de emergencia para la

localización de personas en el mar, como se ha visto en el relleno de las cápsulas espaciales en el océano Atlántico. [5]

La espectroscopia de fluorescencia se puede aplicar a una amplia gama de problemas en las ciencias químicas y biológicas. Las mediciones pueden proporcionar información sobre procesos moleculares, incluyendo las interacciones de las moléculas del disolvente con fluoróforos, difusión rotacional de las moléculas biológicas, los cambios conformacionales y las distancias entre los sitios en las biomoléculas. [5]

1.2.2 Espectroscopia de Fluorescencia sincrónica (SFS). En la fluorescencia convencional, un espectro de emisión se obtiene mediante la variación de la longitud de onda en el monocromador de emisión, y manteniendo fija la longitud de onda de excitación. Un espectro de excitación se obtiene mediante el escaneo de diferentes longitudes de onda de excitación manteniendo la longitud de onda de emisión constante. Otro modo de obtener un espectro de fluorescencia es en el que se varía, simultáneamente, la longitud de onda de excitación y emisión, el resultado obtenido se conoce como espectro sincrónico de fluorescencia (SFS). [15]

Dependiendo de las longitudes de onda de excitación y emisión hay tres técnicas básicas de SFS posibles. Si la velocidad de barrido es constante para ambos monocromadores, un intervalo de longitud de onda se mantiene constante, $\Delta\lambda$, que es definido entre la longitud de onda de emisión (λ_{em}) y la longitud de onda de excitación (λ_{ex}). La técnica se conoce como SFS a longitud de onda constante, es muy simple y es la más usada de los métodos sincrónicos. Otra posibilidad es si la longitud de onda de excitación y de emisión varía simultáneamente, de tal manera que una diferencia de frecuencia, $\Delta\nu$, se mantiene constante. Esta técnica se conoce como SFS a energía constante. También existe otra técnica si las longitudes de onda de excitación y de emisión varían simultáneamente, pero a velocidades diferentes. Esto permite la construcción de planos en ángulo entre 45°

y 90° al eje x de excitación a lo largo de todo el espectro. Esta técnica se ha utilizado en muy pocas aplicaciones. [15]

Las principales características de la SFS son el estrechamiento de la banda espectral y simplificación de los espectros de emisión. [5]

La nitidez y el estrechamiento del pico en un espectro de SFS, en comparación con las del espectro de fluorescencia convencional pueden explicarse por medio del diagrama de Jablonski (Figura 2). [14] Una molécula puede ser excitada en una banda de absorción de cualquier longitud de onda desde A₁ hasta A₃ y puede dar fluorescencia en la longitud de onda de F₁ hasta F₃. En general, el espectro de fluorescencia de un fluoróforo es independiente de la longitud de onda de excitación, pero puede variar la intensidad de fluorescencia dependiendo de la probabilidad de la transición electrónica de la molécula. [15]

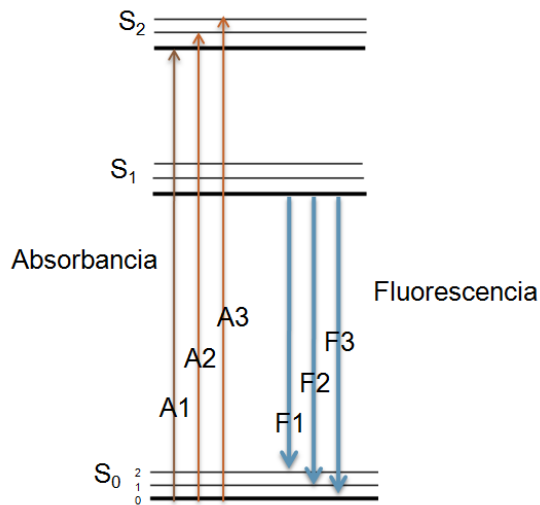


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

Fuente: Lakowicz Joseph .Principles of Fluorescence Spectroscopy

Para obtener un espectro de fluorescencia, la molécula es excitada hasta su máximo de absorción (A_3) y la fluorescencia emite en las longitudes de onda de F_1 a F_3 .^[15]

Un espectro de excitación se obtiene mediante la excitación de una molécula a todos los niveles posibles con longitudes de onda de A_1 a A_3 , y se percibe fluorescencia solo en el máximo de emisión, por ejemplo F_3 .^[15]

En el caso de SFS, se elige un intervalo de longitud de onda particular, de modo que solo se observa una señal de fluorescencia cuando $\Delta\lambda$ coincide en un intervalo entre las longitudes de onda de absorción y emisión. Por lo tanto, en un principio al tomar $\Delta\lambda=A_3$, no se observara fluorescencia hasta que el monocromador de excitación este en A_3 y la longitud de onda de fluorescencia sea F_3 .^[15]

Como la intensidad de emisión es función de la longitud de onda de excitación (que se establece con la relación probabilidad/población de la transición), y $\Delta\lambda$ se define a partir de la longitud de onda de absorción y emisión, se obtiene un pico más pronunciado en SFS en comparación con un espectro convencional.^[15]

1.2.3 Espectrofluorímetro. Es interesante notar que el fluoróforo conocido por primera vez, la quinina, fue responsable de estimular el desarrollo de espectrofluorímetros, el primero apareció en la década de 1950. Durante la segunda guerra mundial el Departamento de Guerra estaba interesado en el control de los medicamentos antipalúdicos, como la quinina. Este ensayo temprano de la droga resultó en un nuevo programa de los Institutos Nacionales de Salud para desarrollar la primera práctica con el espectrofluorímetro.^[5]

Un espectrofluorímetro de uso común está equipado de una lámpara como fuente de luz excitante, monocromadores, compartimiento para la muestra y tubos fotomultiplicadores esencialmente. En la actualidad la fuente de luz más versátil

para un espectrofluorímetro es una lámpara de arco de xenón, estas lámparas proporcionan una salida de luz relativamente continua desde 250 hasta 700nm. Los monocromadores seleccionan longitudes de onda tanto de excitación como de emisión. El monocromador puede contener a su vez rejillas que reducen la luz difusa, es decir, luz con longitudes de onda diferentes a la elegida. La fluorescencia se detecta con tubos fotomultiplicadores y la salida de la información se suele presentar en forma gráfica y se almacena digitalmente. [5]

1.2.4 Marcadores Fluorescentes. La fuente de fluorescencia en proteínas puede deberse a fluoróforos intrínsecos como el triptófano o la tirosina y también puede ser causada por un colorante que se une covalente o no covalentemente a la proteína conocido como marcador fluorescente o fluoróforo extrínseco. [16]

1.2.4.1 Fluoróforos Intrínsecos. Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), constituyen los fluoróforos intrínsecos de las proteínas (tabla 2). [5]

Tabla 2. Parámetros de fluorescencia de aminoácidos aromáticos en agua a pH neutro

Aminoácido	Absorbancia λ_{\max} (nm)	Fluorescencia λ_{\max} (nm)	Rendimiento cuántico	Tiempo de vida (ns)
Triptófano	295	353	0.13	3.1
Tirosina	275	304	0.14	3.6
Fenilalanina	260	282	0.02	6.8

El triptófano es el aminoácido dominante que causa la fluorescencia intrínseca en la mayoría de proteínas. El rendimiento cuántico y la longitud de onda máxima de emisión asociada con la fluorescencia intrínseca son muy sensibles a la polaridad del medio. El grupo Indol del Triptófano absorbe cerca de 280nm, y emite cerca de 340nm. El espectro de emisión del indol es muy sensible a la polaridad del solvente. La emisión del indol puede ser desplazada hacia el azul si el grupo está

atrapado dentro de una proteína nativa, y su emisión puede pasar a mayores longitudes de onda cuando la proteína se desdobra. ^[5]

Los residuos de triptófano en la albumina sérica están localizados en la posición 214 en la segunda hélice del segundo dominio (subdominio IIA). Los estudios de difracción de rayos X de la proteína permitió localizar los residuos de Triptófano a un lado de las cavidades enlazantes en estos dominios. La fluorescencia del Triptófano ha dado mucha información sobre el medio local de la proteína y se ha encontrado una amplia aplicación como un marcador en análisis de la dinámica y estructura de proteínas. ^[2]

1.2.4.2 Fluoróforos extrínsecos. Los fluoróforos extrínsecos tienen un rendimiento cuántico mucho mayor y por lo tanto permite el uso de la proteína en concentraciones mucho más bajas. Sin embargo marcar la proteína puede causar modificaciones no deseadas en la proteína de interés, lo que afecta su actividad o estabilidad. ^[5, 17]

Los fluoróforos extrínsecos (marcadores fluorescentes) pueden unirse a residuos de cisteína o grupos amino (por ejemplo las que se encuentran en los residuos de lisina o en los grupos N terminales de las proteínas. La mayoría de marcadores fluorescentes tienen un espectro de absorción y emisión en la región visible (500-600nm), por lo tanto una contribución no deseada a la proteína sin marcar es poco probable. ^[5, 17]

1.2.4.3 Apagamiento de la fluorescencia. El apagamiento de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso en el cual se disminuye la intensidad de fluorescencia en una muestra. ^[5]

La intensidad de fluorescencia puede ser disminuida por una amplia cantidad de procesos. Estos incluyen reacciones en estado excitado, reordenamientos

moleculares, transferencia de energía, formación de un complejo en el estado basal y apagamiento colisional. Desde un punto de vista analítico, el más importante de estos procesos es el apagamiento colisional, se produce cuando el fluoróforo en estado excitado se desactiva al entrar en contacto con alguna otra molécula en solución, el cual se llama “Quencher” o apagador. ^[5, 17] Las moléculas no son modificadas químicamente durante este proceso. El apagamiento colisional se describe mediante la ecuación de Stern-Volmer, conocida como: ^[18]

$$\frac{F_0}{F} = \exp(K_q \tau_0 [Q]) = \exp K_{SV} Q \quad \text{Ec. 1}$$

Donde F_0 y F son la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del apagador, respectivamente, K_q es la constante biomolecular de apagamiento, τ_0 es el tiempo de vida promedio del fluoróforo en ausencia del apagador, Q es la concentración del apagador y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer de apagamiento. ^[18]

En la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1), la relación F_0/F no es lineal y muestra una curvatura hacia arriba en altas concentraciones del apagador. A bajas concentraciones la expresión exponencial puede escribirse así: $\exp K_{SV} Q \approx 1 + K_{SV} Q$, haciendo de esta manera la relación de la concentración con el apagamiento, lineal. ^[18] Por lo tanto la ecuación de Stern-Volmer puede expresarse de la siguiente forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} Q$$

En las proteínas, tras la unión de la proteína al marcador fluorescente ocurre una disminución de la intensidad de la fluorescencia del marcador debido al apagamiento directo del fluoróforo por la unión covalente o no covalente que puede ocurrir entre la proteína y el fluoróforo. ^[17]

1.2.4.4 Sulforodamina B (SRB). Los colorantes de rodamina son ampliamente utilizados para teñir material textil y plástico. Evidencias han demostrado que los colorantes de rodamina tienen un potencial de carcinogenicidad para los animales y los seres humanos. [2]

La Sulforodamina B ($C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$) fue empleada como marcador fluorescente en el presente trabajo (Figura 3). Este compuesto es soluble en agua, es un marcador fluorescente polar y los máximos de excitación y emisión son aproximadamente 565 y 586 respectivamente. Su LD_{50} oral en ratones es de 10.3 g/kg. La SRB se comercializa para fines de investigación y no está destinado a alimentos, medicamentos, usos domésticos, agrícolas o cosméticos. [19]

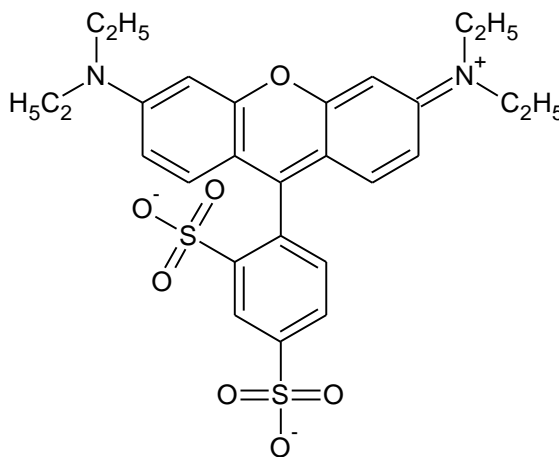


Figura 3. Estructura molecular de SRB

1.2.5 Variables que afectan la fluorescencia

1.2.5.1 La Temperatura. La fluorescencia es altamente sensible a los cambios de temperatura, en ambientes donde hay alta concentración de cromóforos al aumentar la temperatura la intensidad de la fluorescencia disminuye al mismo tiempo que las bandas se hacen más estrechas, la intensidad disminuye principalmente a causa de un apagamiento térmico (la dinámica del sistema) y la

estrechez es causada debido a que los cromóforos son excitados a los estados vibracionales superiores del estado electrónico fundamental. [20]

1.2.5.2 El solvente. Es bien conocido que los solventes que acompañan al fluoróforo pueden generar corrimientos, la introducción de un solvente está relacionado con cambios en la polaridad, constante dieléctrica y cambios en la polarizabilidad del medio que rodea la muestra; los corrimientos por solvente pueden ser contados en términos del efecto sobre todo de las fuerzas de interacción (principalmente del tipo Van der Waals) sobre el sistema π -electrón de la molécula. Este es también conocido que como el sistema π -electrón se vuelve menos localizado, la energía de transición se vuelve más pequeño resultando en corrimiento batocrómico (corrimiento hacia el rojo). [20]

1.2.5.3 El pH. La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de la emisión son, probablemente, diferentes para las formas ionizada y no ionizada del compuesto. Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo surgen del distinto número de especies resonantes asociadas con las formas ácidas y básicas de las moléculas. Cuanto mayor es el número de formas resonantes, mayor es la estabilidad del primer estado excitado. [20]

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MUESTRAS

La BSA y la HSA fueron proporcionadas por el Grupo de investigación en Bioquímica y microbiología (GIBIM). Todas las muestras en estado sólido se almacenaron a 10°C, rotuladas y en tubos de ensayos plásticos con tapón.

La albumina sérica bovina (BSA) empleada es grado analítico, la apariencia física es de cristales de color amarillo, es soluble en agua formando una solución jabonosa totalmente incolora. Una vez preparada la solución se almacenó a 10°C, y se observó que al término de un mes la solución cambia de apariencia tornándose ligeramente blanca y con aspecto turbio.

Siete muestras de albumina sérica humana (HSA) fueron obtenidas de pacientes sanos en exámenes de rutina como control. Los investigadores del grupo GIBIM extrajeron 5ml de sangre a siete pacientes, de los cuales obtuvieron 2ml de plasma y tomaron de este plasma 100µL para realizar la precipitación de la proteína. Las muestras obtenidas no eran cristalinas tenían apariencia coloidal.

Las muestras de HSA fueron numeradas de la siguiente forma: 41, 63, 64, 90, 93, 99 y 100, dicho números solo expresan la procedencia de los pacientes.

Como marcador fluorescentes se empleo Sulforodamina B grado espectroscópico ($C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$) de Eastman Kodak company. Este compuesto es fácilmente soluble en agua y presenta una coloración violeta.

2.1.1 Tratamiento de muestras. Inicialmente todo el material de vidrio empleado para la preparación de muestras debió lavarse con Extran concentrado y agua, posteriormente con ácido clorhídrico al 2% seguido de abundante agua del grifo y finalmente con agua purificada tipo I.

Se preparó una solución patrón de BSA de $3,030 \times 10^{-5}$ M, disolviendo directamente 0.1g de BSA en 50ml de agua tipo I obtenida del Purificador de agua Easy Pure II PF/UV Thermo Scientific ubicado en el laboratorio de instrumentación química en la Universidad Industrial de Santander. A partir de esta solución patrón se prepararon 20 diluciones desde 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-5} M en balones de 5ml. Una vez preparadas las soluciones se almacenaron a 15°C y al término de 5 horas se tomaron los espectros de las mismas, esto con el fin de evitar la desnaturalización de la proteína al estar en medio acuoso. Sin embargo se midieron espectros durante el transcurso de una semana de almacenamiento todos los días y los espectros mostraron cambios significativos solo después de 20 días. Finalmente, se midió el pH de todas las diluciones preparadas anteriormente el cual estuvo en un intervalo de 5.99 a 7.33, teniendo cuidado de que el rango de pH se mantuviera constante, adicionando al patrón de proteína una solución de Britton-Robinson (Mezcla de H_3BO_3 0.04M, H_3PO_4 0.04M y CH_3COOH 0.04M titulada al pH deseado con NaOH 0.2M), puesto que los cambios de pH son sensibles a la fluorescencia y pueden afectar la estabilidad del método.

Las muestras de HSA se disolvieron cada una en 100ml de agua tipo I, se almacenaron a 15°C y se cuidó que el intervalo de pH se mantuviera constante entre 5.99-7.5. La solución obtenida mostró turbidez, por lo tanto se realizó ultrasonido a baja velocidad y posteriormente centrifugación durante 15 minutos a 1500rpm puesto que se seguía observando sólidos en suspensión probablemente debido a la presencia de ácidos grasos. Una vez centrifugada con el sobrenadante de la solución se obtuvieron los espectros de fluorescencia y fluorescencia sincrónica de la proteína marcada y sin marcar.

Para el empleo del marcador fluorescente de la proteína se preparó un patrón de Sulforodamina B grado espectroscópico de 1×10^{-6} M aforado con una solución de ácido acético al 2,5%, debido a que en condiciones acidas la Sulforodamina B aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y los sitios potenciales de unión para moléculas cargadas en la BSA ó HSA son la Histidina, Lisina y Arginina terminal. Posteriormente, se prepararon diluciones de BSA en concentraciones de 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-5} M empleando la solución patrón de $3,030 \times 10^{-5}$ M de BSA y aforando cada una de las diluciones con la solución de Sulforodamina B en ácido acético, los balones que contenían los patrones de BSA-SRB se envolvieron en papel aluminio para evitar el paso de la luz ya que la SRB es fotosensible, al adquirir espectros sin prevenir este efecto la intensidad de fluorescencia fue variable con respecto a la concentración. Una vez realizada la preparación de cada patrón se dejó pasar 10 minutos para la toma de espectros, si se adquieren antes de este tiempo la intensidad de fluorescencia también varía considerablemente. Finalmente, Se midió el pH de cada una de las diluciones el cual estuvo en un rango de 2,85 a 3,14

2.2 ULTRAVIOLETA/VISIBLE

Inicialmente para establecer la longitud de onda de excitación en espectroscopia de fluorescencia se hace necesario obtener el espectro de absorción de la muestra en el medio que va ser analizada.

Una vez se conoce el máximo de absorción se establece este valor como la longitud de onda de excitación para la obtención del espectro de emisión.

Con el fin de establecer parámetros que permitan obtener mejor sensibilidad, con la longitud de onda del máximo de emisión se puede obtener el espectro de excitación, el cual puede presentar uno o varios máximos que se utilizan para

determinar cuál de estos producen espectros reproducibles y con la mejor sensibilidad.

2.2.1 Instrumentación. Se empleó el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible de UV-2400PC Shimadzu ubicado en el laboratorio de instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander. Además, se empleó una celda para fluorimetría de cuarzo Starna con tapón, de camino óptico 10mm, rectangular, con espesor de base y ventana de 1.25mm, volumen nominal de 3.5ml y pulida por las cuatro caras y la base.

2.2.2 Adquisición de espectros UV/Vis

2.2.2.1 Espectro UV/Vis de BSA. El espectro de absorbancia de la BSA (Figura 4) fue tomado empleando las siguientes condiciones: rango de longitud de onda de 200-800nm, velocidad de escaneo media, intervalo de muestreo 1.0nm, modo de escaneo automático, ancho de hendidura de 0.5nm y concentración del patrón de empleado de BSA 3×10^{-5} M.

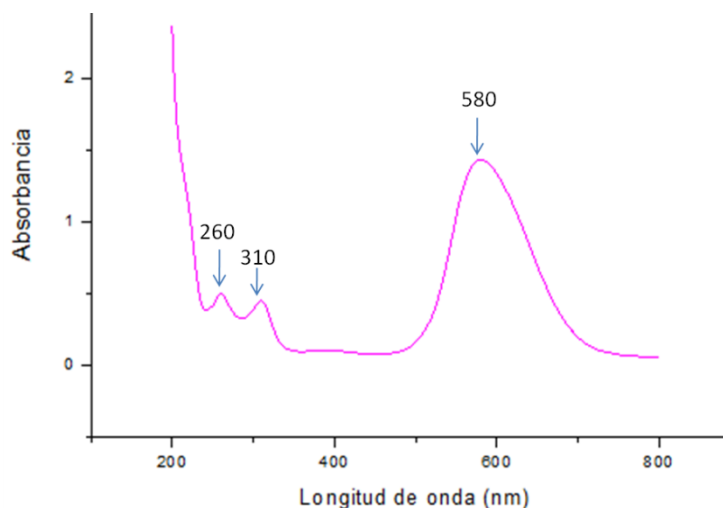


Figura 4. Espectro absorbancia de patrón de BSA 3×10^{-5} M

2.2.2.2 Espectro de Sulforodamina B. El espectro de absorbancia de la Sulforodamina B (Figura 5) fue tomado empleando una solución de 1×10^{-6} M, bajo las siguientes condiciones: rango de longitud de onda de 190-800nm, velocidad de escaneo media, intervalo de muestreo 0.5nm, modo de escaneo automático y ancho de hendidura de 0.5nm.

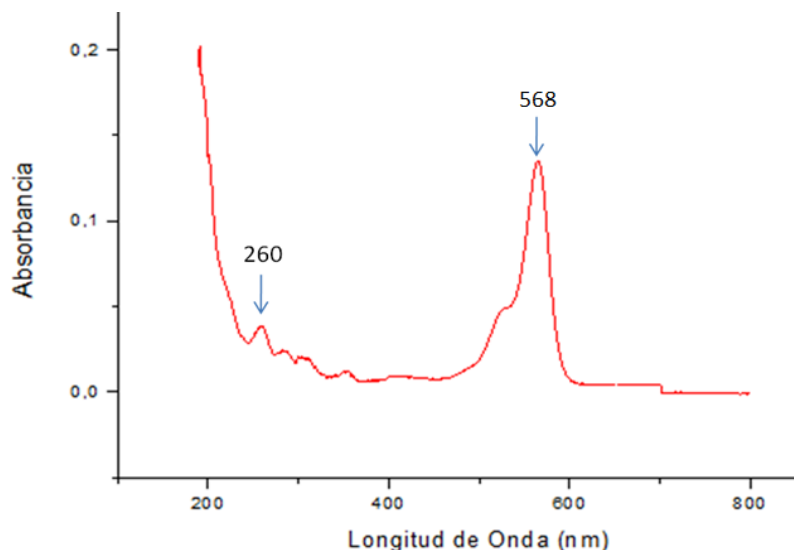


Figura 5. Espectro de absorbancia de patrón de SRB 1×10^{-6} M

2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

2.3.1 Instrumentación. Para la adquisición de espectros de fluorescencia y fluorescencia sincrónica se empleó el Espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40 (Photon Technology International/Quanta Master) ubicado en el laboratorio de instrumentación química de la universidad industrial de Santander (Figura 6). Este equipo cuenta con lámpara de arco de Xenón, rendijas, monocromadores, compartimiento para la muestra, filtros, detector y un computador instalado con el software FelixGX usado para la obtención y análisis de datos de fluorescencia. FelixGX controla el instrumento, almacena los datos de fluorescencia y provee un sinnúmero de herramientas necesarias para la presentación y el análisis de datos,

además de que los datos pueden ser exportados a otros programas para otros procesamientos o análisis adicional.

En el espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40 se pueden adquirir diferentes tipos de espectros: emisión, excitación, sincrónico, decaimientos múltiples, emisión en el dominio del tiempo y polarización basada en el tiempo.

Para la toma de espectros de fluorescencia, 3ml de la muestra o patrón deben depositarse en una celda para fluorimetría. En este trabajo se empleó una celda de cuarzo *Starna* con tapón, de camino óptico 10mm, rectangular, con espesor de base y ventana de 1.25mm, volumen nominal de 3.5ml y pulida por las cuatro caras y la base. Con el fin de eliminar residuos y material interferente después del escaneo de cada muestra o patrón, se lavó la celda con Extran concentrado, ácido clorhídrico 2M, abundante agua del grifo y agua tipo I, finalmente antes de depositar la celda en el portamuestra se limpió todas las caras de la misma con servilletas de papel absorbente puesto que debido a la manipulación se puede depositar grasa de los dedos en las caras de la celda

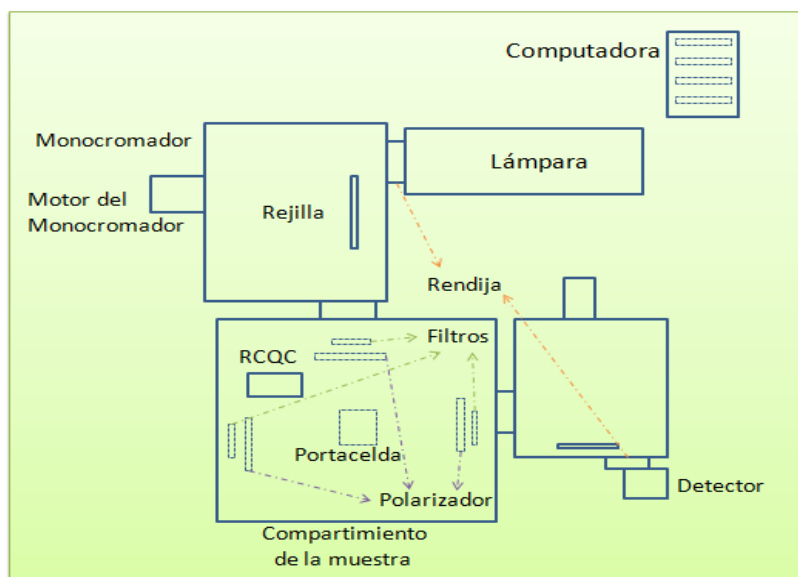


Figura 6. Espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM-40.

2.3.3 Establecimiento de parámetros. Para la adquisición de todos los espectros de excitación, fluorescencia y fluorescencia sincrónica se mantuvieron siempre constantes las siguientes condiciones: ancho de las dos rendijas de excitación 0.5mm, ancho de las dos rendijas de emisión 0.25mm, tamaño de paso 1nm, integración 1 segundo y las correcciones de excitación y emisión (RCQC) habilitadas.

La señal RCQC es adquirida en tiempo real y varía con la longitud de onda. Para obtener una corrección óptima, se establece la longitud de onda en la posición donde la máxima señal RCQC podría ser obtenida para el rango de longitud de onda que va a ser adquirido y posteriormente se ajusta la ganancia para obtener la señal RCQC deseada.

La longitud de onda tanto de excitación como de fluorescencia y el ajuste de la ganancia de la señal son condiciones propias de cada compuesto o muestra a analizar, estas condiciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 3. Parámetros para la obtención de espectros de excitación y fluorescencia

Tipo de espectro y muestra	Longitud de Onda de excitación [nm]	Longitud de onda de emisión [nm]	Ganancia de la señal [V]	Longitud de onda para ganancia de la señal
Excitación de BSA	230-345	340	1.20-1.21	340
Fluorescencia de BSA y HSA	275	emisión 280-500 ($\Delta\lambda=220\text{nm}$)	1.20-1.21	340
Sincrónico de BSA y HSA	230-320 ($\Delta\lambda=90\text{nm}$)	300-390 ($\Delta\lambda=90\text{nm}$)	1.20-1.21	340
Fluorescencia de SRB	586	569-700 ($\Delta\lambda=131\text{nm}$)	1.20-1.21	568
Fluorescencia de BSA y HSA marcadas	586	569-700 ($\Delta\lambda=131\text{nm}$)	1.20-1.21	568

2.4 ANALISIS DE LOS ESPECTROS OBTENIDOS

Una vez obtenidos tanto los espectros de fluorescencia como de fluorescencia sincrónica de la BSA y HSA, se integró cada espectro haciendo una sumatoria de cada una de las intensidades. De esta forma se pudo determinar el área bajo la

curva de cada uno de los espectros adquiridos con el fin de construir una curva de calibración de la concentración de BSA en función de las áreas bajo la curva de cada concentración respectivamente. Posteriormente para evaluar las muestras de HSA, igualmente se determina el área bajo la curva de los espectros obtenidos y se reemplaza este valor en la curva de calibración correspondiente.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 DISPERSIÓN RAMAN DEL AGUA

La dispersión Raman del agua (Figura 7) es usada como un chequeo rápido de la integridad funcional del espectrofotómetro de fluorescencia en general y también como medida de la sensibilidad. Este pico de baja intensidad en el espectro no es debido a la fluorescencia sino a la dispersión Raman ya que la luz dispersada es observada a una longitud de onda mayor que la de excitación. La longitud de onda del máximo de la banda Raman del agua depende de la longitud de onda de excitación ya que el alejamiento de la longitud de onda de excitación es una medida de la energía vibracional del enlace H-O en solución acuosa. El pico dispersado esta siempre desplazado hacia el rojo 3382cm^{-1} de la longitud de onda de excitación. Generalmente, la banda de dispersión Raman se presenta en: [16, 21]

$$\frac{1}{\lambda_{ex}} - 3.6 \times 10^{-4} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde λ_{ex} es la longitud de onda de excitación en nm.

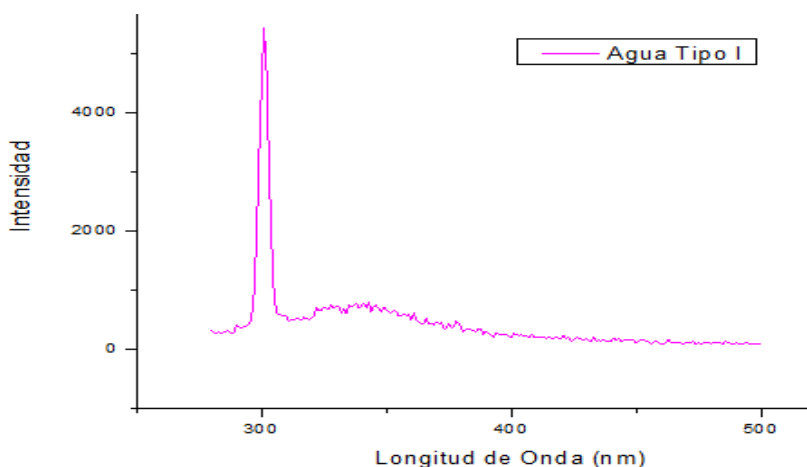


Figura 7. Espectro de la Dispersión Raman del Agua

Debido a que la BSA y HSA se disuelven en medio acuoso, en los espectros de los patrones de baja concentración como por ejemplo 3×10^{-7} M se puede observar un hombro en el espectro en 301nm debido a la dispersión Raman del agua. (Figura 8). De acuerdo con la ecuación (2) la banda Raman en este caso debería presentarse en 305.2nm por ende el valor obtenido experimentalmente no se encuentra muy alejado.

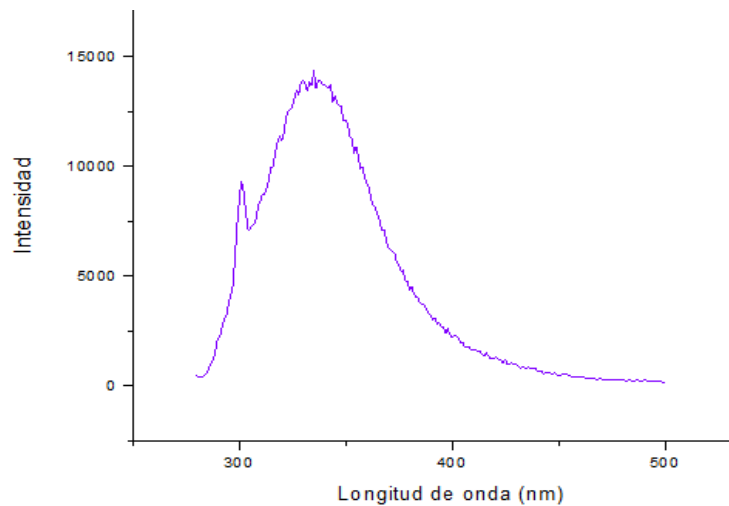


Figura 8. Espectro de Fluorescencia del patrón de BSA 3×10^{-7} M

3.2 FLUORESCENCIA DE BSA

El espectro de excitación de BSA mostró tres máximos en 275, 283 y 291nm (Figura 9), por lo tanto se probaron estos máximos para determinar cual ofrecía un espectro de emisión con mejor intensidad y que preferiblemente partiera de la línea base para no tener inconvenientes en el cálculo de integración del espectro. Como resultado se obtuvo que al mantener la longitud de onda de excitación en 275nm el espectro de emisión cumplía con las condiciones mencionadas anteriormente.

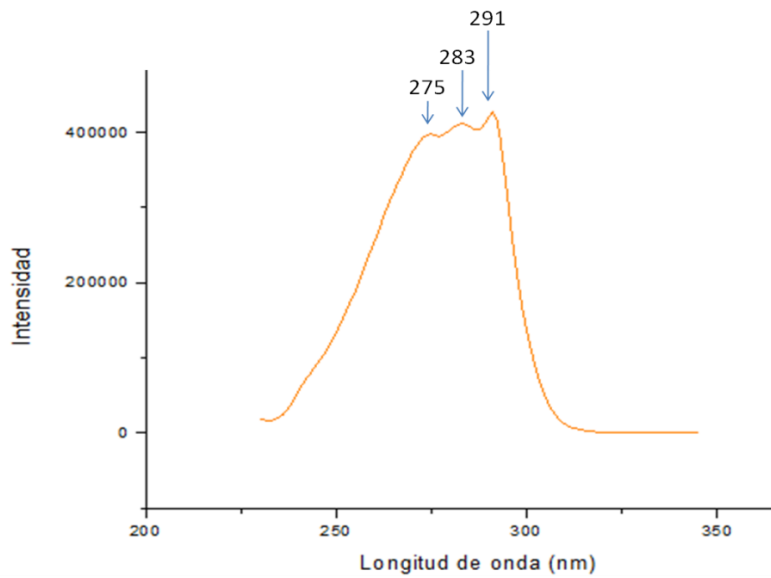


Figura 9. Espectro de excitación de BSA 3×10^{-5} M

La albumina sérica bovina tiene tres fluoróforos intrínsecos, el triptófano (Trp), la Tirosina (Tyr) y la fenilalanina. La fluorescencia intrínseca de BSA excitada en 295nm se atribuye principalmente a la presencia de residuos de Trp y Tyr. La BSA mostro un pico máximo de emisión en 340nm cuando se excitó a 275nm características típicas de la fluorescencia intrínseca de Trp y Tyr.

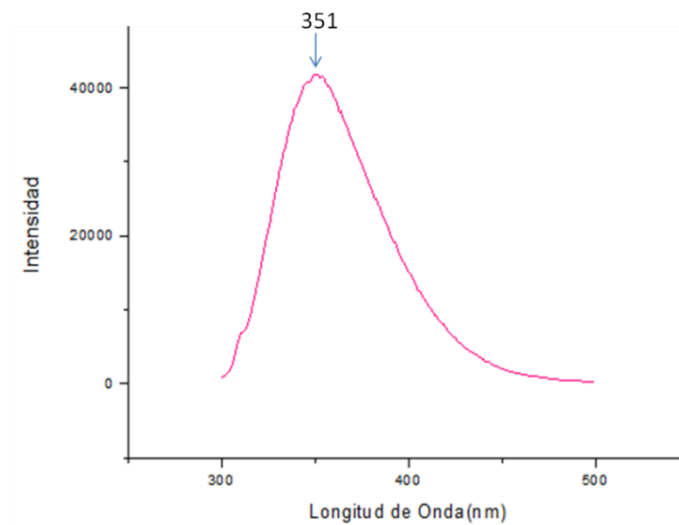


Figura 10. Espectro de fluorescencia del Trp 1×10^{-5} M ($\lambda_{ex}=282\text{nm}$, $\lambda_{em}=300\text{-}500\text{nm}$, demás condiciones constantes)

Debido a que la concentración de albumina sérica Bovina (BSA) es directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia (Figura 11) fue posible establecer una curva de calibración preparando patrones de la proteína en diferente concentración y por medio de su espectro de fluorescencia determinar el área bajo curva del espectro realizando una suma cada una de las intensidades del mismo (tabla 4). La concentración más baja de BSA empleada para la curva de calibración fue de 1×10^{-7} M debido a que en concentraciones menores el pico de dispersión Raman presenta mayor intensidad que la banda debida a la proteína en 340nm.

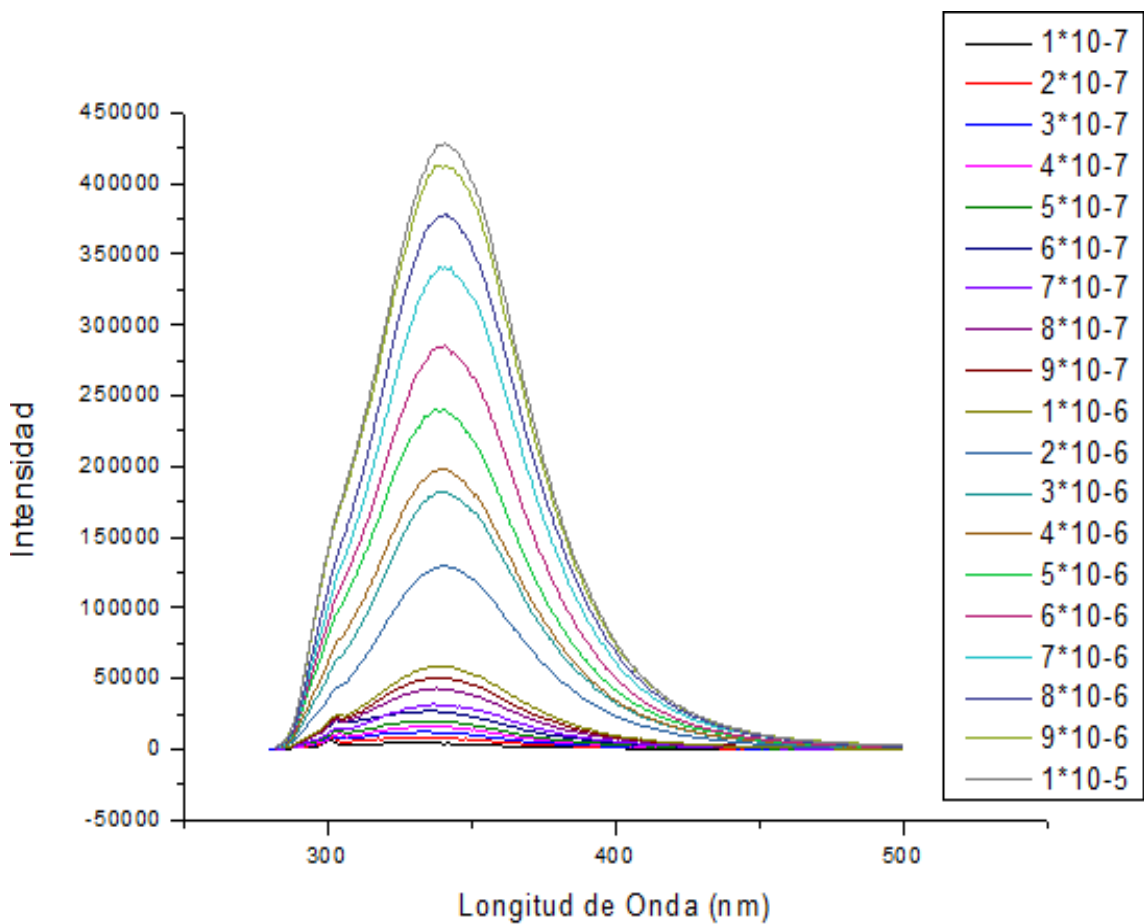


Figura 11. Espectros de fluorescencia de diferentes patrones de BSA

De cada patrón de BSA de concentración conocida se realizaron cinco replicas y se tomó su espectro de fluorescencia con el fin de analizar la repetibilidad del método. Para esto se calculó el coeficiente de varianza o desviación estándar relativa (CV), empleando la ecuación 3, el cual es una medida del error relativo. El coeficiente de varianza en este caso tuvo porcentajes no mayores al 5% (tabla 4), por lo tanto se puede establecer que siguiendo el protocolo de preparación de muestras y adquisición de espectros se puede garantizar la repetibilidad del método.

$$CV = \frac{s}{x} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde s es la desviación estándar y x es el promedio de la réplica de áreas bajo la curva de cada espectro.

Tabla 4. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia de BSA

Concentración de BSA	Área bajo la curva del Primer espectro	Área bajo la curva de la Replica #1	Área bajo la curva de la Replica # 2	Área bajo la curva de la Replica # 3	Área bajo la curva de la Replica # 4	Área bajo la curva de la Replica # 5	Coeficiente de Varianza en %
1,0E-07	3,34E+05	3,31E+05	3,40E+05	3,38E+05	3,43E+05	3,45E+05	1,499
2,0E-07	6,89E+05	6,64E+05	6,47E+05	6,29E+05	6,39E+05	6,54E+05	3,179
3,0E-07	1,00E+06	9,84E+05	9,83E+05	9,67E+05	9,28E+05	8,90E+05	4,412
4,0E-07	1,15E+06	1,19E+06	1,19E+06	1,19E+06	1,15E+06	1,17E+06	1,677
5,0E-07	1,42E+06	1,44E+06	1,44E+06	1,42E+06	1,38E+06	1,42E+06	1,368
6,0E-07	2,07E+06	2,07E+06	2,05E+06	2,05E+06	2,05E+06	2,05E+06	0,474
7,0E-07	2,29E+06	2,25E+06	2,49E+06	2,19E+06	2,41E+06	2,37E+06	4,782
8,0E-07	3,11E+06	3,20E+06	3,22E+06	2,91E+06	2,92E+06	3,01E+06	4,432
9,0E-07	3,61E+06	3,57E+06	3,42E+06	3,56E+06	3,65E+06	3,50E+06	2,337
1,0E-06	4,15E+06	4,07E+06	4,00E+06	4,11E+06	4,13E+06	4,01E+06	1,502
2,0E-06	9,23E+06	9,14E+06	8,91E+06	9,03E+06	8,87E+06	8,85E+06	1,727

3,0E-06	1,27E+07	1,23E+07	1,23E+07	1,23E+07	1,25E+07	1,25E+07	1,149
4,0E-06	1,36E+07	1,37E+07	1,38E+07	1,38E+07	1,37E+07	1,35E+07	0,765
5,0E-06	1,71E+07	1,65E+07	1,71E+07	1,71E+07	1,68E+07	1,71E+07	1,420
6,0E-06	2,06E+07	2,03E+07	2,01E+07	2,00E+07	1,98E+07	1,99E+07	1,501
7,0E-06	2,44E+07	2,43E+07	2,39E+07	2,38E+07	2,36E+07	2,32E+07	1,823
8,0E-06	2,69E+07	2,65E+07	2,67E+07	2,69E+07	2,63E+07	2,70E+07	1,019
9,0E-06	2,87E+07	2,84E+07	2,81E+07	2,82E+07	2,86E+07	2,87E+07	0,948
1,0E-05	2,89E+07	2,91E+07	2,92E+07	2,96E+07	2,96E+07	3,00E+07	1,296

La curva de calibración para BSA en condiciones optimas se muestra en la figura 12 y los parámetros analíticos de muestran en la tabla 5. Esta curva de calibración también se puede aplicar para la cuantificación de HSA puesto que BSA y HSA son proteínas homologas y por ende los resultados son consistentes.

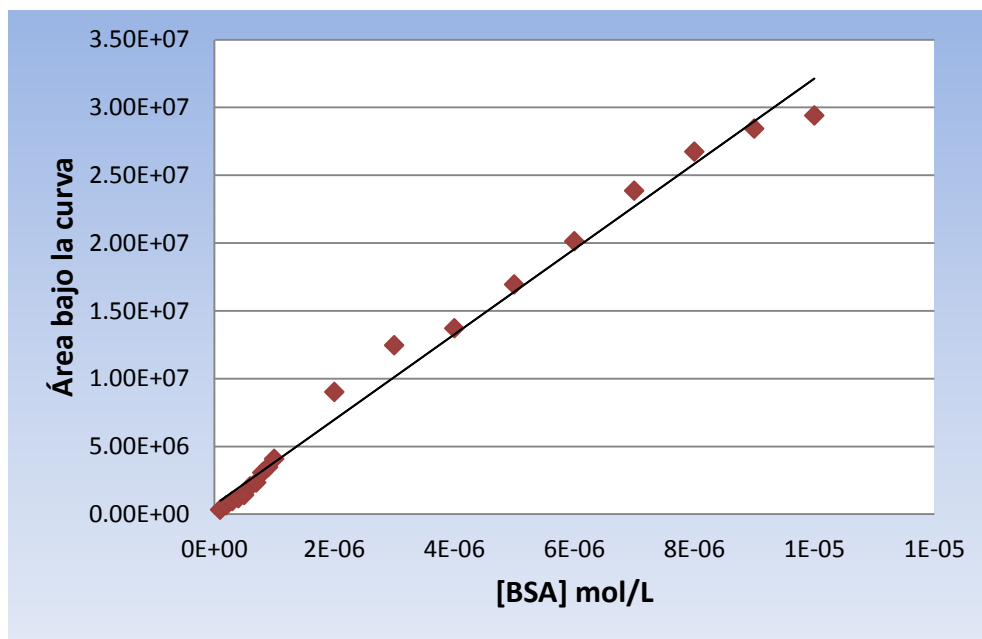


Figura 12. Curva de calibración para la determinación de BSA y HSA empleando fluorescencia

Tabla 5. Parámetros analíticos para BSA y HSA empleando fluorescencia

Ecuación de la regresión lineal (x e y, mol/L)	Coefficiente de correlación	Limite de detección	Limite de cuantificación	Sensibilidad
$y = 3,00 \cdot 10^{12}x + 69047$	0,988	$5,076 \cdot 10^{-09}$	$1,692 \cdot 10^{-08}$	$3,00 \cdot 10^{12}$

El coeficiente de correlación obtenido muestra el buen ajuste de la curva de calibración a los datos experimentales obtenidos ya que es muy próximo a la unidad.

El límite de detección y cuantificación están directamente relacionados con la sensibilidad del método. El límite de detección (LOD) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad, en este caso la concentración es de orden nanomolar por ende se podría emplear este método para realizar ultramicroanálisis de la proteína. El límite de detección se calcula como:

$$LOD = \frac{3s}{b} \quad Ec. 4$$

Siendo s la desviación estándar y b la pendiente de la ecuación de regresión lineal

El límite de cuantificación (LQD) se define como la cantidad de analito presente derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con precisión y exactitud (Ecuación 5). De acuerdo con esta definición se puede medir BSA empleando fluorescencia hasta una concentración de $1,692 \times 10^{-8}$ M con precisión y exactitud el cual un límite que supera los estándares de los métodos actuales de cuantificación de la proteína.

$$LQD = \frac{10s}{b} \quad Ec. 5$$

Siendo s la desviación estándar y b la pendiente de la ecuación de regresión lineal

Según la IUPAC la sensibilidad se define como el cociente entre la señal medida y la concentración de analito. Cuando se trabaja con curvas de calibración la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada, por tanto la sensibilidad del método de cuantificación empleando fluorescencia es muy elevado (tabla 5) y se comprueba que fluorescencia es una técnica altamente sensible para la cuantificación tanto de BSA como de HSA.

3.3 FLUORESCENCIA SINCRÓNICA DE BSA

Empleando fluorescencia sincrónica se logró reducir el ancho de banda espectral con respecto a la fluorescencia convencional de la BSA en 130nm (tabla 3), ya que en fluorescencia el ancho de banda es de 220nm y en fluorescencia sincrónica solo es de 90nm, esto se realizó con el fin de simplificar el espectro de fluorescencia. El máximo de emisión en los espectros de fluorescencia sincrónica se encuentra en 350nm y la intensidad de fluorescencia se mantiene constante con respecto a los espectros de fluorescencia convencional.

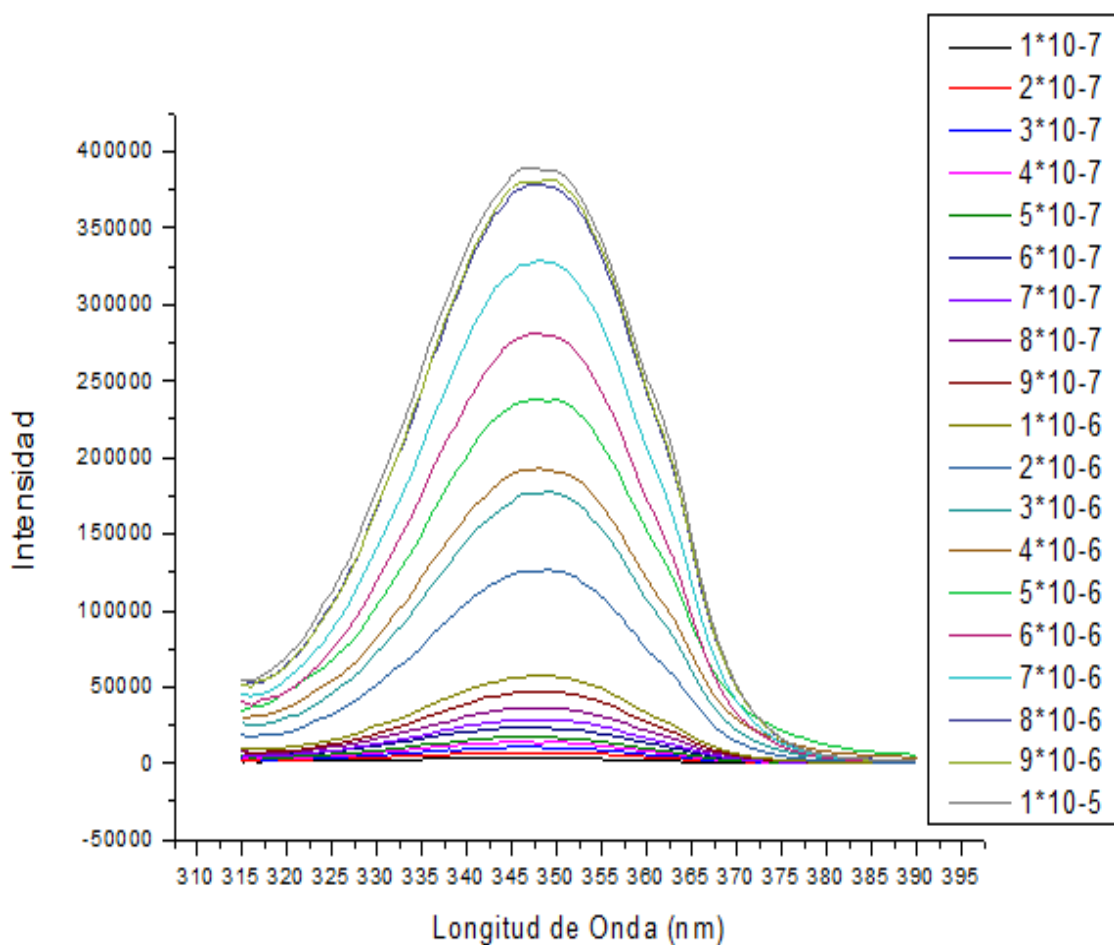


Figura 13. Espectros de fluorescencia sincrónica de diferentes patrones de BSA

Tabla 6. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia sincrónica de BSA

Concentración de BSA	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Coeficiente de Varianza en %
	bajo la curva del Primer espectro	bajo la curva de la Replica #1	bajo la curva de la Replica # 2	bajo la curva de la Replica # 3	bajo la curva de la Replica # 4	bajo la curva de la Replica # 5	
1,0E-07	1,25E+05	1,22E+05	1,17E+05	1,34E+05	1,33E+05	1,31E+05	5,664
2,0E-07	2,38E+05	2,28E+05	2,25E+05	2,68E+05	2,64E+05	2,75E+05	8,823
3,0E-07	4,10E+05	4,00E+05	3,84E+05	3,66E+05	3,66E+05	3,61E+05	5,349
4,0E-07	5,74E+05	5,57E+05	5,36E+05	4,87E+05	4,85E+05	4,76E+05	8,062
5,0E-07	6,33E+05	6,27E+05	6,17E+05	5,83E+05	5,79E+05	5,80E+05	4,136

6,0E-07	7,76E+05	7,92E+05	7,88E+05	7,85E+05	7,82E+05	7,86E+05	0,700
7,0E-07	9,07E+05	9,23E+05	1,11E+06	9,62E+05	9,63E+05	9,48E+05	7,387
8,0E-07	1,29E+06	1,34E+06	1,36E+06	1,13E+06	1,18E+06	1,23E+06	7,115
9,0E-07	1,51E+06	1,51E+06	1,48E+06	1,39E+06	1,41E+06	1,41E+06	3,859
1,0E-06	1,69E+06	1,76E+06	1,71E+06	1,80E+06	1,80E+06	1,79E+06	2,816
2,0E-06	3,92E+06	3,95E+06	4,01E+06	4,00E+06	3,96E+06	3,95E+06	0,768
3,0E-06	5,58E+06	5,52E+06	5,43E+06	5,56E+06	5,59E+06	5,58E+06	1,092
4,0E-06	6,25E+06	6,32E+06	6,29E+06	6,41E+06	6,35E+06	6,37E+06	0,898
5,0E-06	7,67E+06	7,92E+06	7,79E+06	7,92E+06	7,98E+06	7,83E+06	1,459
6,0E-06	9,00E+06	8,94E+06	8,86E+06	8,93E+06	8,96E+06	8,92E+06	0,458
7,0E-06	1,04E+07	1,09E+07	1,07E+07	1,06E+07	1,06E+07	1,05E+07	1,544
8,0E-06	1,17E+07	1,20E+07	1,21E+07	1,19E+07	1,16E+07	1,20E+07	1,599
9,0E-06	1,24E+07	1,23E+07	1,23E+07	1,23E+07	1,23E+07	1,23E+07	0,440
1,0E-05	1,32E+07	1,30E+07	1,32E+07	1,31E+07	1,29E+07	1,32E+07	1,107

Como se puede ver en la figura 13 el espectro parte de 315nm y no de 300nm como se estableció en los parámetros de la tabla 3, debido a que en el intervalo de 300-315nm aparece parte de la longitud de onda excitación que no hace parte del espectro de fluorescencia sincrónica, si se cambia el intervalo de longitud de onda de emisión en el equipo, la intensidad del espectro disminuye considerablemente. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente el ancho de banda del espectro de fluorescencia sincrónica se reduce a solo 75nm.

Se adquirió el espectro de fluorescencia sincrónica de la serie de diluciones de BSA de concentración desde 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-5} M (figura 13), de cada dilución se prepararon cinco replicas y se tomó su respectivo espectro con el fin de analizar la repetibilidad de los espectros considerando la variabilidad con respecto a la preparación de patrones y condiciones optimas del equipo de fluorescencia. A cada espectro se determinó el área bajo la curva sumando cada una de las intensidades del espectro (tabla 6), y se calculó el coeficiente de varianza el cual estuvo en un intervalo de 0.4136-8.823%, este porcentaje superó el adquirido en

fluorescencia convencional el cual no supera el 5%, por lo tanto hay un poco mas de variabilidad en los espectros de fluorescencia sincrónica comparada con los espectros de fluorescencia convencional.

Tabla 7. Parámetros analíticos para BSA y HSA empleando fluorescencia sincrónica

Ecuación de la regresión lineal (x e y, mol/L)	Coefficiente de correlación	Limite de detección	Limite de cuantificación	Sensibilidad
$y = 1,00 \cdot 10^{12} x + 27813$	0,986	$2,141 \cdot 10^{-8}$	$7,139 \cdot 10^{-8}$	$1,00 \cdot 10^{12}$

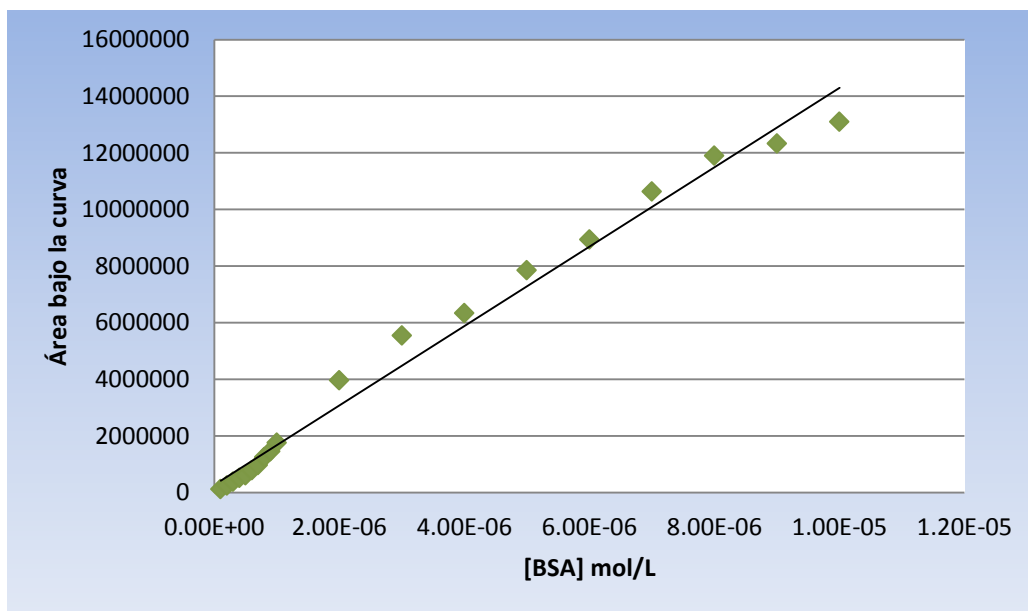


Figura 14. Curva de calibración para la determinación de BSA y HSA empleando fluorescencia sincrónica

Así mismo con el promedio de áreas bajo la curva de cada patrón se construyó una curva de calibración a partir de los espectros de fluorescencia sincrónica

como se muestra en la figura 14 y los parámetros analíticos de la misma se muestran en la tabla 7.

A partir de los parámetros estadísticos puede determinarse que el ajuste de los datos a la curva de calibración es muy buena, los límites de detección y cuantificación disminuyen mínimamente con respecto a los obtenidos empleando fluorescencia convencional e igualmente la sensibilidad y se obtienen ventajas al simplificarse el espectro ya que se reduce el ancho de banda espectral, se evitan efectos perturbadores por interferencias (por ejemplo la banda de dispersión Raman desaparece) y se disminuye el tiempo de análisis ya que se recorre un rango de longitudes de onda más estrecho.

3.4 FLUORESCENCIA DE BSA MARCADA CON SRB

Se determinó que en condiciones ácidas (pH entre 2.85-3.14) la Sulforodamina B (SRB) aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de la proteína puesto que se puede observar en la intensidad de fluorescencia un decaimiento o apagamiento de la señal proporcional a la concentración de BSA debido a la unión no covalente de la proteína al marcador. Inicialmente se trabajó a pH entre 5.99-7.5 al igual como se realizó con la proteína sin marcar, pero a pH neutro la Histidina, Lisina y Arginina, sitios potenciales de unión, están protonados y por tanto la unión electrostática entre la SRB y la proteína no es factible. Como resultado se obtuvo una señal de fluorescencia aleatoria con respecto a la concentración de proteína. Además se observó que la concentración del marcador empleada debe ser de orden semejante en magnitud a la concentración de proteína, de lo contrario los resultados no son satisfactorios con respecto a la linealidad del método.

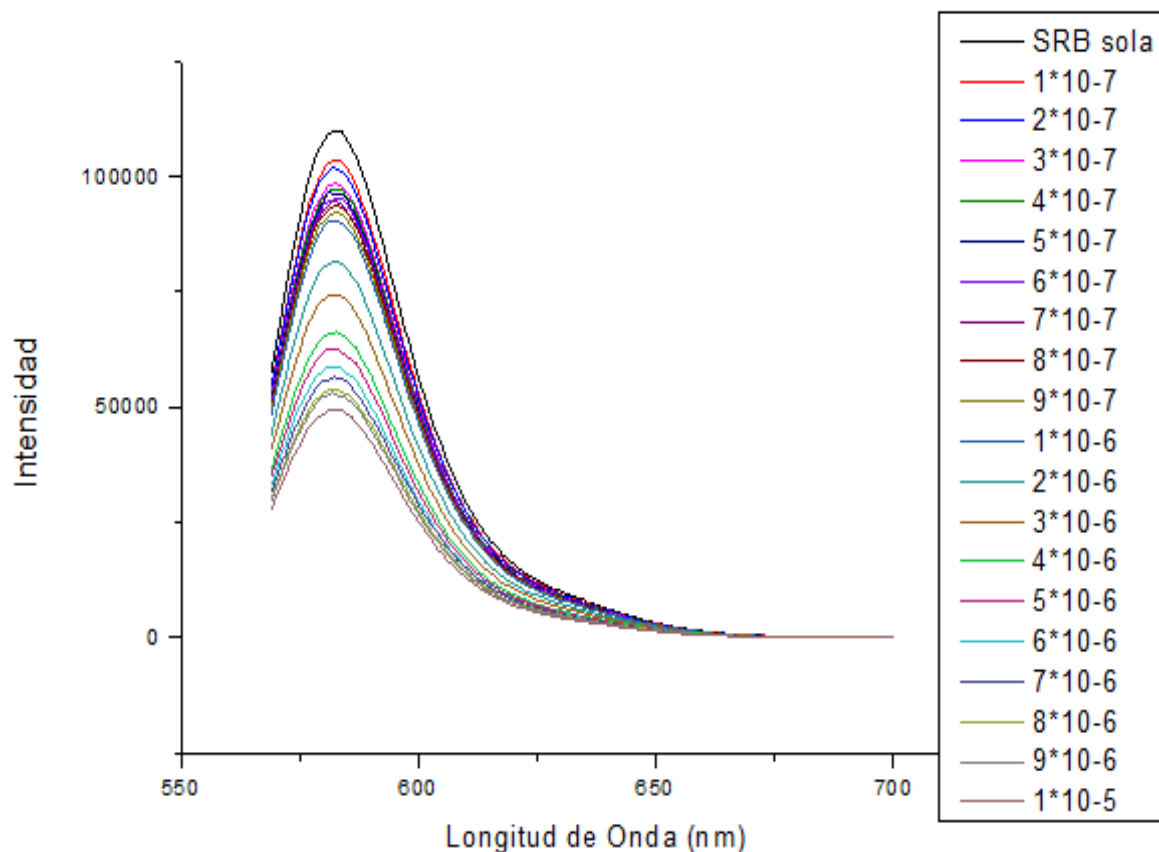


Figura 15. Espectros de fluorescencia de SRB apagada con BSA

La sulforodamina B es un marcador fluorescente que exhibe una alta fluorescencia de tres órdenes de magnitud mayor a la BSA y unida a esta proteína se produce un apagamiento en su señal de fluorescencia proporcional a la concentración de proteína, debido a esto se obtuvieron espectros de apagamiento de fluorescencia de la SRB inducido por la BSA en una serie de concentraciones desde 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-5} M y de cada uno de estos se realizaron cinco replicas para determinar la variabilidad con respecto a la estabilidad del método (tabla 8).

Como se puede ver en la figura 15 la fluorescencia de la Sulforodamina B sola es la señal más intensa y a medida que aumenta la concentración de proteína la señal disminuye relativamente, por lo tanto el fluoróforo en este caso es la SRB y el apagador de la fluorescencia es la BSA. Solo fue posible disminuir la

concentración hasta 1×10^{-7} M porque a menor concentración la señal no es proporcional al apagamiento de la SRB.

Tabla 8. Área bajo la curva de espectros de fluorescencia de SRB apagada con BSA

Concentración de BSA	Área bajo la curva del Primer espectro	Área bajo la curva de la Replica #1	Área bajo la curva de la Replica # 2	Área bajo la curva de la Replica # 3	Área bajo la curva de la Replica # 4	Área bajo la curva de la Replica # 5	Coefficiente de Varianza en %
0	3,69E+06	3,67E+06	3,69E+06	3,70E+06	3,70E+06	3,69E+06	0,254
1,0E-07	3,47E+06	3,48E+06	3,48E+06	3,48E+06	3,48E+06	3,48E+06	0,155
2,0E-07	3,47E+06	3,42E+06	3,40E+06	3,41E+06	3,43E+06	3,44E+06	0,704
3,0E-07	3,30E+06	3,30E+06	3,31E+06	3,32E+06	3,32E+06	3,33E+06	0,395
4,0E-07	3,27E+06	3,27E+06	3,26E+06	3,26E+06	3,26E+06	3,26E+06	0,080
5,0E-07	3,24E+06	3,26E+06	3,25E+06	3,25E+06	3,24E+06	3,24E+06	0,253
6,0E-07	3,20E+06	3,20E+06	3,19E+06	3,18E+06	3,18E+06	3,17E+06	0,410
7,0E-07	3,18E+06	3,16E+06	3,15E+06	3,15E+06	3,15E+06	3,15E+06	0,373
8,0E-07	3,14E+06	3,14E+06	3,14E+06	3,15E+06	3,15E+06	3,16E+06	0,243
9,0E-07	3,09E+06	3,14E+06	3,13E+06	3,13E+06	3,09E+06	3,10E+06	0,690
1,0E-06	3,00E+06	3,04E+06	3,06E+06	3,06E+06	3,07E+06	3,07E+06	0,969
2,0E-06	2,72E+06	2,73E+06	2,74E+06	2,75E+06	2,73E+06	2,74E+06	0,335
3,0E-06	2,49E+06	2,51E+06	2,51E+06	2,52E+06	2,52E+06	2,52E+06	0,398
4,0E-06	2,21E+06	2,20E+06	2,20E+06	2,20E+06	2,21E+06	2,22E+06	0,299
5,0E-06	2,10E+06	2,09E+06	2,09E+06	2,08E+06	2,09E+06	2,09E+06	0,197
6,0E-06	1,97E+06	1,98E+06	1,98E+06	1,98E+06	1,98E+06	1,98E+06	0,203
7,0E-06	1,90E+06	1,94E+06	1,95E+06	1,96E+06	1,96E+06	1,97E+06	1,200
8,0E-06	1,81E+06	1,83E+06	1,83E+06	1,83E+06	1,83E+06	1,83E+06	0,351
9,0E-06	1,78E+06	1,77E+06	1,77E+06	1,77E+06	1,76E+06	1,76E+06	0,316
1,0E-05	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06	0,094

El coeficiente de varianza del conjunto de réplicas de cada uno de los espectros de apagamiento de fluorescencia no supera el 1.2% demostrando que la repetibilidad del método es excelente (tabla 8). Esto comprueba una vez más que el espectrofotómetro de fluorescencia se encuentra en condiciones óptimas y que

el protocolo de preparación de patrones muestras ofrece resultados satisfactorios. Además, la interacción electrostática entre la SRB y la proteína es estable para la cuantificación de BSA o HSA empleando espectrofotometría de fluorescencia ya que muestra mayor estabilidad que al cuantificar la proteína sola como se puede comprobar en su bajo coeficiente de varianza.

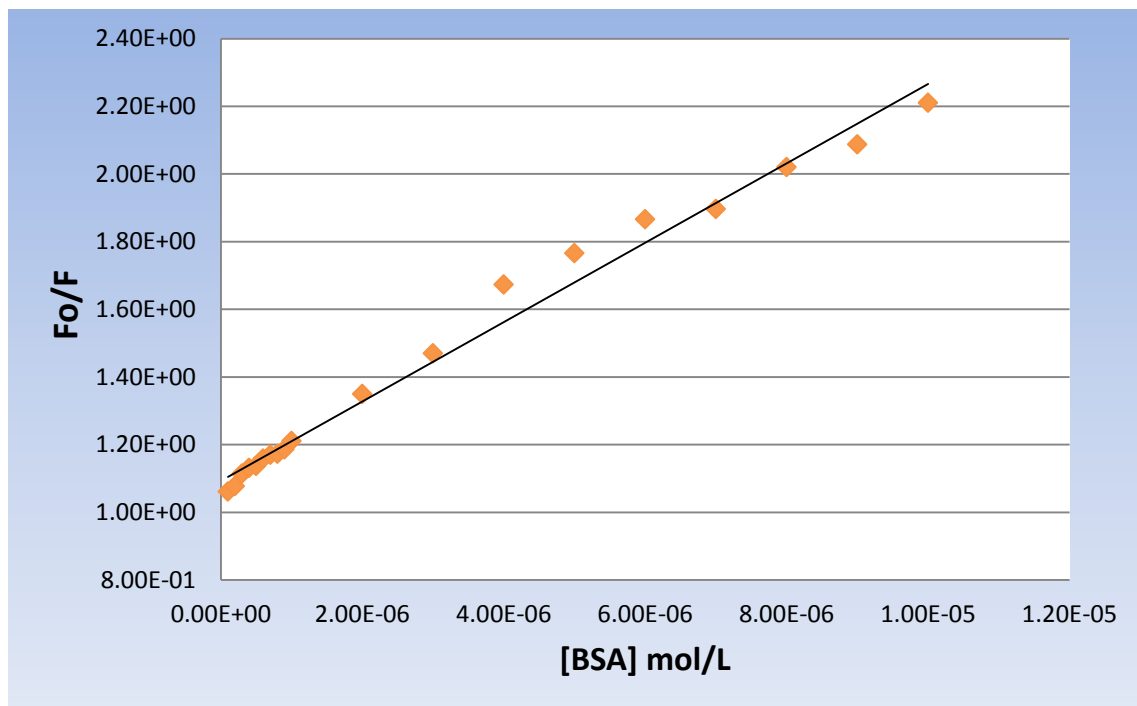


Figura 16. Grafica de Stern-Volmer para el apagamiento de SRB con BSA

El apagamiento de la fluorescencia se describe mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1). Al aplicar esta ecuación a los espectros de fluorescencia de la SRB apagada con BSA, F_0 es el área bajo la curva del espectro de SRB sola sin la presencia de BSA, F es el área bajo la curva de cada uno de los espectros de SRB con diferentes concentraciones de BSA (tabla 8) y Q es la concentración de BSA en mol/L. Para esto, se construyó una curva de calibración de F_0/F versus la concentración de BSA. Debido a que la relación entre F_0/F y Q es lineal, la pendiente de dicha curva de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer,

corresponde a la constante de Stern-Volmer. Además, la linealidad en la grafica de Stern-Volmer indica la presencia de un solo fluoróforo, ya que si dicha grafica no fuese lineal podría suponerse la presencia de dos o más poblaciones distintas de fluoróforos. La grafica obtenida (Figura 16) muestra un buen coeficiente de correlación ($R^2=0.986$) y la constante de Stern-Volmer es de $1,1727 \times 10^4$ L/mol*s.

La constante de Stern-Volmer K_{SV} , indica la sensibilidad del fluoróforo al apagador de la fluorescencia. Los valores de K_{SV} se encuentran frecuentemente en un rango entre 1-3 L/mol, este valor corresponde a un apagamiento en un radio esférico de 10 \AA el cual es mayor que la distancia de un enlace de Van der Waals entre fluoróforo y el apagador. Un fluoróforo que está muy unido en una macromolécula suele ser inaccesible para los apagadores o “quenchers” solubles en agua, para estos el valor de K_{SV} es bajo. Por el contrario si el fluoróforo está libre en solución o en la superficie de una biomolécula, se obtienen valores altos de K_{SV} .^[5] Por lo tanto, podemos afirmar que la BSA se une eficientemente a la SRB y además que la SRB tiene una buena accesibilidad a la BSA debido a que la constante de Stern-Volmer tiene un valor elevado.

En los espectros de la figura 16 se puede observar claramente un aumento en la intensidad de emisión de las concentraciones más bajas de BSA comparada con los espectros de fluorescencia obtenidos con la proteína sin la presencia del marcador. Esto es indispensable, ya que se mejora la sensibilidad del método haciendo posible la cuantificación tanto de BSA como de HSA en concentraciones mucho más bajas.

3.5 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS OBTENIDOS A MUESTRAS DE HSA

Como se ha mencionado anteriormente la BSA y HSA son proteínas homologas, por lo tanto las curvas de calibración obtenidas empleando fluorescencia y

fluorescencia sincrónica con BSA marcada y sin marcar se pueden emplear para cuantificar HSA.

3.5.1 Fluorescencia de HSA. Los espectros de fluorescencia obtenidos de las muestras de HSA sin marcar, proporcionadas por el grupo GIBIM, son muy semejantes a los espectros de BSA. El máximo de emisión en fluorescencia de todas las muestras de HSA se observa en 333nm (Figura 17), el máximo de emisión se encuentra desplazado hacia longitudes de onda menores en relación a los obtenidos con BSA debido a que las muestras proporcionadas no son completamente puras, lo que queda demostrado cuando las muestras se someten a ultrasonido y centrifugación y a pesar de esto se siguen observando sólidos en suspensión muy probablemente a la presencia de ácidos grasos, presentes generalmente en el plasma sanguíneo. Sin embargo se tomó el sobrenadante de la solución ya que la HSA es bastante soluble en agua. La variabilidad en los espectros adquiridos con respecto a la BSA es mínima y los resultados por tanto se pueden considerar concordantes.

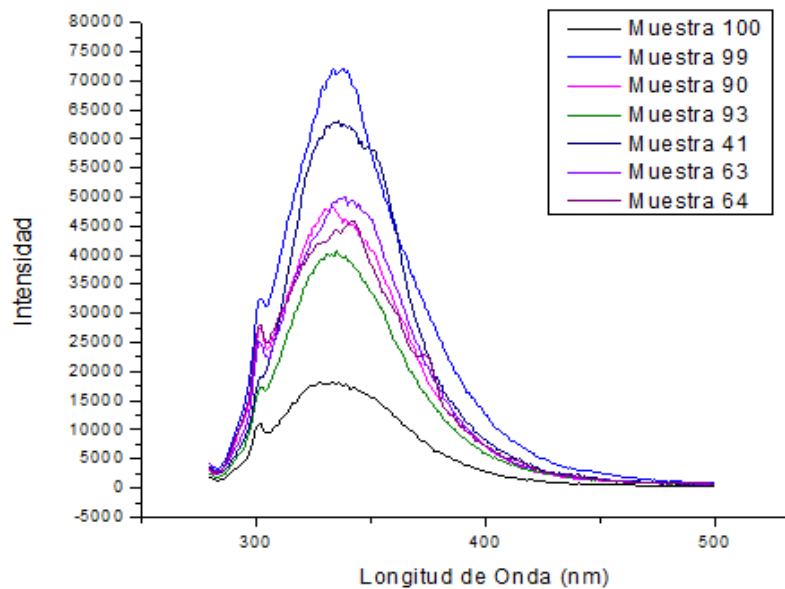


Figura 17. Espectros de fluorescencia de muestras de HSA

A cada espectro de las muestras de HSA se determinó el área bajo la curva sumando cada una de las intensidades del espectro. Este valor se reemplazó en la ecuación de la regresión lineal obtenida con BSA sin marcar, $y = 3,00 \cdot 10^{12}x + 69047$ (Tabla 5), donde y es el área bajo la curva calculada a partir del espectro obtenido y x es la concentración de HSA en la solución. Como la extracción de las muestras de HSA se realizó de 100µl de suero, se realizaron los cálculos para este volumen y así determinó la concentración de la proteína en sangre. Estos valores se muestran en la tabla 9.

El rango normal de albumina en suero humano es de 34 a 54 g/L, por lo tanto todas las muestras, excepto la muestra 100 que está por debajo del rango, se encuentran dentro de estos límites normales establecidos y aprobados por los métodos actuales de cuantificación. Esto demuestra que el método implementado empleando fluorescencia convencional es eficaz para la cuantificación de HSA en sangre, puesto que la determinación fue satisfactoria para las muestras problema.

Tabla 9. Cuantificación de HSA sin marcar empleando fluorescencia

Área bajo la curva			
Muestra de HSA	espectros de fluorescencia	[Sln] M	[En sangre] g/L
41	4146238,34	1,36E-06	44,8491
90	3484522,541	1,14E-06	37,5702
64	4700717,351	1,54E-06	50,9483
63	4386669,308	1,43E-06	47,4938
93	4160826,218	1,34E-06	44,2500
100	2656924,831	8,63E-07	28,4666
99	3228841,308	1,05E-06	34,7577

3.5.2 Fluorescencia Sincrónica de HSA. También se tomaron espectros de fluorescencia sincrónica a las siete muestras de HSA (Figura 18), en estos

espectros el máximo de emisión se encuentra en 345nm. Al igual que los espectros de fluorescencia el máximo en la longitud de onda de emisión se desplaza hacia longitudes de onda mayores con respecto a los espectros de BSA pero el espectro es muy similar, por lo tanto, se determinó el área bajo la curva de los mismos para cuantificar la concentración de la proteína en sangre. Los resultados se muestran en la tabla 10, como podemos observar los resultados de la concentración de proteína en sangre son muy similares empleando ambos métodos lo que demuestra la eficiencia para cuantificar HSA empleado tanto fluorescencia como fluorescencia sincrónica.

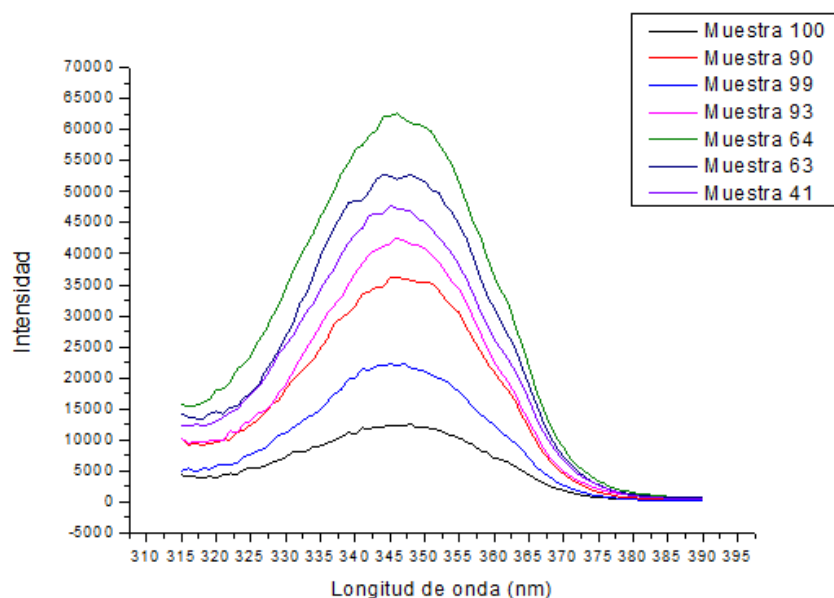


Figura 18. Espectros de fluorescencia Sincrónica de muestras de HSA

Tabla 10. Cuantificación de HSA sin marcar empleando fluorescencia Sincrónica

Muestra de HSA	Área bajo la curva espectros de fluorescencia	[Sln] M	[En sangre] g/L
41	699482,893	6,72E-07	44,3302
90	607678,571	5,80E-07	38,2711
64	800550,642	7,73E-07	51,0007
63	742830,155	7,15E-07	47,1911
93	683847,031	6,56E-07	43,2982
100	442856,066	4,15E-07	27,3928

3.5.3 Fluorescencia de SRB apagada con HSA. Con el fin de cuantificar HSA empleando los resultados obtenidos con apagamiento de fluorescencia se tomaron espectros de la Sulforodamina B apagada con las diferentes muestras de HSA. En la Figura 19 se puede ver que efectivamente hay apagamiento de la fluorescencia de la SRB ocasionada por la HSA puesto que se observa disminución en la señal de fluorescencia con respecto a la intensidad de fluorescencia de la SRB sola sin la presencia de HSA.

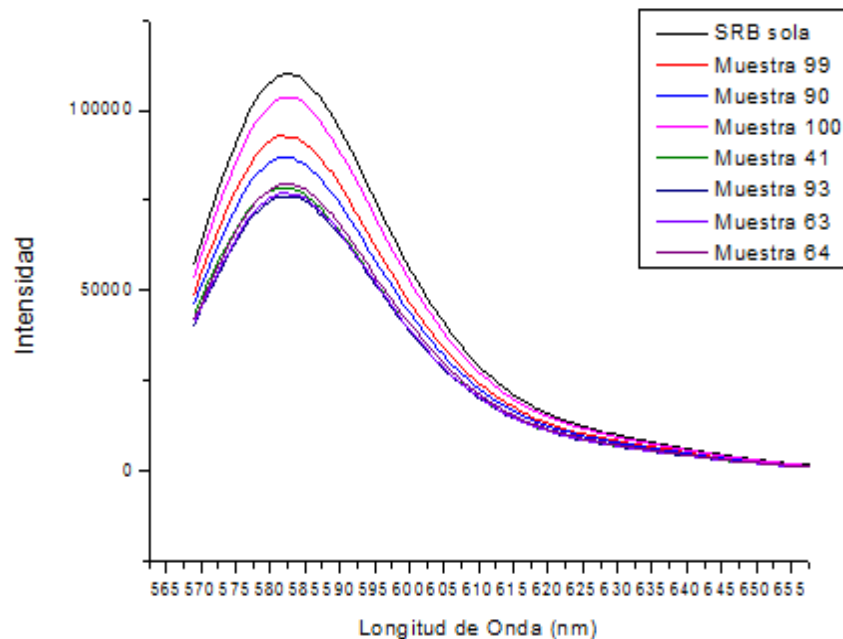


Figura 19. Espectros de SRB apagada por diferentes muestras de HSA

Se determinó el área bajo la curva de los espectros obtenidos y se cuantificó la concentración de HSA en la solución y en sangre realizando los cálculos para 100 μ l, cantidad con la que realizó la precipitación de la proteína. Para determinar la concentración de HSA en la solución se empleó la ecuación de Stern-Volmer obtenida con la BSA:

$$\frac{F_0}{F} = K_{VS} Q = 1,1727 * 10^4 Q \quad \text{Ec. (6)}$$

Los resultados que se muestran en la tabla 11 son concordantes con los obtenidos empleando fluorescencia convencional y fluorescencia sincrónica, por lo tanto, podemos afirmar que el apagamiento de fluorescencia utilizando SRB para cuantificar HSA es un método eficiente y arroja resultados confiables y repetibles.

Tabla 11. Cuantificación de HSA marcada con SRB empleando fluorescencia

Área bajo la curva			
Muestra de HSA	espectros de fluorescencia	[Sln] M	[En sangre] g/L
41	466004345,667	6,75E-07	44,5746
90	537526918,782	5,86E-07	38,6436
64	401683720,111	7,84E-07	51,7122
63	439968817,596	7,15E-07	47,2123
93	474437700,949	6,63E-07	43,7823
100	754463266,361	4,17E-07	27,5321
99	589755363,359	5,34E-07	35,2213

Al observar la figura 17 con respecto a la figura 18 y 19, los espectros de fluorescencia convencional de la HSA muestran mayor variabilidad en su apariencia en relación con a los espectros de fluorescencia sincrónica y apagamiento de la fluorescencia. En los parámetros estadísticos el método que mostró menor variabilidad fue apagamiento de fluorescencia el cual mostró un coeficiente de varianza menor al 1.2%, por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos con las muestras de HSA podría pensarse que el empleo tanto de fluorescencia sincrónica como de apagamiento de fluorescencia arrojan resultados más confiables que la fluorescencia convencional.

Cabe resaltar que empleando estos métodos de cuantificación el tiempo de análisis se reduce considerablemente con respecto a los métodos ya establecidos los cuales requieren de uno o varios días. Utilizando fluorescencia, una vez la proteína es precipitada, el tiempo de análisis es de 10 minutos y con fluorescencia sincrónica se reduce aún más el tiempo ya que el intervalo de longitudes de onda es mucho más corto, tomando alrededor de tan solo 7 minutos. Esto es de vital importancia en el ámbito de la salud, ya que obtener resultados confiables y en el menor tiempo posible puede ayudar en el diagnóstico oportuno de enfermedades, que pueden resultar mortales para el ser humano si no se detectan a tiempo.

4. CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió cuantificar HSA y BSA empleando espectroscopia de fluorescencia, fluorescencia sincrónica y apagamiento de la fluorescencia.

La espectroscopia de fluorescencia demostró ser muy útil en la cuantificación de BSA y HSA proporcionando parámetros de detección y cuantificación de $5,076 \times 10^{-9}$ y $1,692 \times 10^{-8}$ mol/L respectivamente y con una sensibilidad de $3,00 \times 10^{12}$.

La espectroscopia de fluorescencia exhibe gran facilidad a la hora de preparar ensayos. Para ello solo hay que contar con BSA o HSA, ya sea en disolución en agua u otro medio biológico, que no necesita de un compuesto fluorescente si no que puede permanecer en solución, permitiendo análisis en rangos muy reducidos como el nanomolar. Por otro lado, una vez que se hace una medida de fluorescencia la muestra no resulta alterada, esta puede ser tratada y analizada nuevamente.

Los espectros de fluorescencia sincrónica tienen varias ventajas con respecto a los espectros de fluorescencia convencional como la repetibilidad, reducción del ancho de banda espectral y evita diferentes efectos perturbadores. En este estudio se cuantificó HSA y BSA empleando fluorescencia sincrónica, alcanzando un límite de detección de $2,141 \times 10^{-8}$ mol/L.

La fluorescencia de BSA y HSA es sensible al pH, debido a la existencia de grupos funcionales ácidos o básicos en este tipo de proteínas. Los cambios en la emisión de la proteína provienen del número de especies resonantes diferentes que están asociadas con las formas ácidas o básicas de las moléculas.

Se estudió la interacción de SRB con la BSA empleando espectroscopia de fluorescencia. Los resultados experimentales indican que probablemente el apagamiento de la fluorescencia de la SRB fue inducido por la BSA por medio de un apagamiento estático debido a interacciones electrostáticas. La constante de apagamiento (K_{SV}) obtenida fue $1,1727 \times 10^4 \text{L/mol}$.

Los resultados obtenidos empleando los métodos descritos en este estudio nos permiten establecer que las muestras analizadas se encuentran dentro de los límites de detección establecidos con las curvas de calibración de los patrones de BSA, y las cuales presentan concentraciones de HSA en sangre entre 34 y 54 g/L; señalados como niveles normales de HSA, lo que indica que la fluorescencia es un método fiable y adecuado para aplicaciones prácticas.

5. RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio y aprovechando las ventajas que ofrece la espectroscopia de fluorescencia, es posible la implementación de este método para desarrollar y mejorar la adquisición y funcionamiento de los análisis, en la determinación de los niveles de HSA.

Sin embargo se pueden obtener mejores resultados en cuanto a sensibilidad y toxicidad si se consideran marcadores biológicos que reproduzcan los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. HOU, X., TONG, X., DONG, W., DONG, C., SHUANG, S., Synchronous fluorescence determination of human serum albumin with methyl blue as a fluorescence probe. *Spectrochimica Acta Part A* 66 (2007) 552–556
2. HUAI-HONG Cai, XING Zhong, PEI-HUI Yang, WEI Wei, JIANAN Chen, JIYE Cai. Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372 (2010) 35–40
3. ROCHE Marjolaine, RONDEAU Philippe, RANJAN Singh Nihar, TARNUS Evelyne, BOURDON Emmanuel. The antioxidant properties of serum albumin. Minireview, *FEBS Letters* 582 (2008) 1783–1787
4. JUN Wang, YUWEI Guo, BIN Liu, CHUNPING Cheng, ZHIQIU Wang, JINGQUN Gao, XIANGDONG Zhang, GUANGXI Han. Spectroscopic analyses on interaction of bovine serum albumin (BSA) with toluidine blue (TB) and its sonodynamic damage under ultrasonic irradiation. *Journal of Luminescence* (2010)
5. LAKOWICZ Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Springer (2006) 5-10
6. GROEMPING Yvonne and HELLMANN Nadja. *Current Protocols in Protein Science* (2005) 20.8.1-20.8.27
7. JUARÉZ Josué, TABOADA Pablo, MOSQUERA Víctor. Existence of Different Structural Intermediates on the Fibrillation Pathway of Human Serum Albumin. *Biophysical Journal* Volume 96 March 2009 2353–2370

8. YUE-SHENG Li, YU-SHU Ge, YUE Zhang, AI-QING Zhang, SHAO-FA Sun, FENG-LEI Jiang, YI Liu. Interaction of coomassie brilliant blue G250 with human serum albumin: Probing of the binding mechanism and binding site by spectroscopic and molecular modeling methods. *Journal of Molecular Structure* 968 (2010) 24–31
9. HONG-Wen Gao, GING Xu, LING Chen, WANG Shi-long, WANG Yuan, WU Ling-Ling, YUAN Yuan. Potential Protein Toxicity of Synthetic Pigments: Binding of Poncean S to Human Serum Albumin. *Biophysical Journal*. Volume 94(2008) 906–917
10. CHADBORN Neil, BRYANT Jason, BAIN J. Angus, O'SHEA Paul. Ligand-Dependent Conformational Equilibria of Serum Albumin Revealed by Tryptophan Fluorescence Quenching. *Biophysical Journal* Volume 76 April 1999 2198–2207
11. YAN-JUN Hu, YI Liu, YU Ou-Yang, XIAO-HE Xiao, CHUN-MEI Dai. Binding of berberine to bovine serum albumin: spectroscopic approach. *Mol Biol Rep* (2010) 37:3827–3832
12. BIN Qiu, LONGHUA Guo, MINGLUAN Chen, ZHENYU Lin, GUONAN Chen. Study on interaction between a new fluorescent probe 2-methylbenzo[b][1,10]phenanthroline-7(12H)-one and BSA. *Analyst* (2011), 136, 973–978
13. DESJARDINS Philippe, HANSEN B. Joel, ALLEN Michael. Microvolume Spectrophotometric and Fluorometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* 3.10.1-3.10.16, February 2009
14. DONG-hui li, HUANG-hao yang, HONG zhen, YING fang, QING-zhi zhu, JIN-gou xu. Fluorimetric determination of albumin and globulin in human serum

using tetra-substituted sulphonated aluminum phthalocyanine. analytical chemical acta 401 (1999)

15. DIGAMBARA Patra, A.K. MISHRA. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. Trendin analytical chemistry (2002), volume 21
16. PAIN H. Roger. Determining the Fluorescence Spectrum of a Protein. Current Protocols in Protein Science (2004) 7.7.1-7.7.20
17. YVONNE Groemping, NADJA Hellmann. Spectroscopic Methods for the Determination of Protein Interactions. Current Protocols in Protein Science (2005) 20.8.1-20.8.27
18. VALEUR Bernard. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2001 Wiley-VCH Verlag GmbH
19. (En línea) <http://probes.invitrogen.com/media/msds/01307.html>. Material Safety Data Sheet. Revision Date: 3-Aug-2004. [Citado el 1 June de 2011]
20. CONTRERAS Toloza Wilmar Antonio. Construcción de un modelo predictivo de la fracción S.A.R.A. de crudos colombianos a partir de espectroscopia (LIF) y métodos estadísticos (Quimiometría). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular, 2011
21. PTI Fluorescence Master System. FelixGX Software User's Manual. PTI, Photon Technology International. Version 2.0 (2009)