

PRODUCCIÓN DE ALBÚMINA BOVINA EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS

Luis F. González*, María Teresa Acuña **, Jenny Lara ☆
Danilo Villalobos ☆☆, Ivette Peña**

Key Word Index:

Resumen

Se hace una evaluación comparativa de dos métodos aplicados a la producción de albúmina a partir de plasma bovino: Precipitación con sulfato de amonio y Fraccionamiento etanólico por el método de Hao.

El objetivo del trabajo es establecer la calidad del producto obtenido por ambos métodos, y establecer cuál podría adaptarse mejor a las condiciones económicas y de infraestructura de Costa Rica para la producción en gran escala. En los resultados se observó una recuperación del 59 por ciento y una pureza del 78,9 por ciento de albúmina con el método de sulfato de amonio. Con el método etanólico se obtuvo una recuperación del 68,5 por ciento con un 97,8 por ciento de pureza.

Se concluyó, que el método etanólico es el más ventajoso, por el mayor rendimiento y el alto grado de pureza obtenido. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1985; 6(2).105—114]

Introducción

La separación de los componentes proteínicos del plasma humano y de otras especies animales, ha constituido, hasta ahora, un campo de gran importancia en la investigación científica, no sólo desde el punto de vista del conocimiento bioquímico de muchos fenómenos, sino también en su aplicación inmediata a diversas áreas. Es de reconocido valor, por ejemplo el fraccionamiento de antígenos y anticuerpos en la producción de antisueños, el uso de la albúmina humana pura en la reposición de la presión oncótica, la purificación de inmunoglobulinas para la elaboración de estándares de aplicación diagnóstica y mucho más (1,3,9,11,12).

Desde el siglo pasado, se describió en la literatura, el primer método para la separación de albúmina y globulinas, por precipitación con sulfato de amonio (18). Posteriormente se han venido realizando trabajos similares, basados en los principios empleados por Hofmeister (12,17).

Las investigaciones realizadas por Cohn y colaboradores en la década de los años cuarenta (3), constituyen la base fundamental para muchos logros posteriores y todavía el método tradicional de Cohn es la base del fraccionamiento del plasma en muchos países. Se emplea intensamente para la producción de varios componentes, incluyendo albúmina bovina (12,17). También se observó que la adición de solventes orgánicos parcial o completamente solubles en agua, como etanol, acetona, metanol y dietileter, pueden usarse para separar las proteínas en solución acuosa (10,13,14,16).

* Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos, Costa Rica.
** Hospital La Anexión, Nicoya. Guanacaste, Costa Rica.
☆ Ministerio de Salud, Puntarenas, Costa Rica.
☆☆ Lab. Clínico Dr. Carlos Páez. San José. Costa Rica.

En las últimas décadas, han sido numerosas las técnicas de purificación descritas, además de las citadas, algunas de las cuales emplean equipo sofisticado. Entre ellas podemos citar aquellas que emplean: rivanol, polietinglicol, electroforesis, resinas de intercambio iónico, sephadex, filtración de geles y ultracentrifugación (1,8).

Debido a que muchos de estos procedimientos, por su costo y sus características, no son aplicables a la producción en gran escala, se ha dado prioridad, dependiendo del producto requerido, a aquellas que no sólo brindan las mayores facilidades en cuanto al equipo y las condiciones requeridas, sino también que dan origen a un producto de alta o aceptable pureza.

La albúmina bovina ha sido empleada especialmente en estudios inmunológicos e inmunohematológicos; desde que en 1945 se descubrió su capacidad para promover la aglutinación específica de eritrocitos humanos por anticuerpos IgG (4,12).

Actualmente se utiliza también en las pruebas cruzadas de compatibilidad, en la determinación de factor Rh-hr en tubo, como diluyente o estabilizador en estudios con factores de características particulares y en la preparación de estándares para la cuantificación de proteínas o albúminas séricas (2,5,7,12,18).

El presente trabajo es una evaluación comparativa de dos métodos, aplicados a la producción de albúmina a partir de plasma bovino.

- a) Precipitación con sulfato de amonio (1,8,12).
- b) Fraccionamiento etanólico por medio del método de Hao (6).

El objetivo es establecer la calidad del producto obtenido en ambos y, al mismo tiempo, tratar de definir cuál puede adaptarse a las condiciones económicas y de infraestructura de nuestro país para la producción en gran escala.

Materiales y Métodos

Se utilizó sangre bovina anticoagulada, con citrato de sodio $2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,15 M a razón de 140 ml por litro de sangre, recogida en botellas de vidrio y tomando las precauciones del caso para evitar la hemólisis.

La sangre se centrifugó 15 minutos, a 3000 rpm (Centrífuga Sorvall C₂) para separar el plasma, el cual se mantuvo a 4°C el menor tiempo posible, con merthiolate 1:10000 como preservante, hasta el momento de iniciar el fraccionamiento. De aquí se tomaron alícuotas de 100 ml para el estudio de ambos métodos.

a. Obtención de albúmina por precipitación con sulfato de amonio

1. Precipitación del fibrinógeno.

Se prepararon 100 ml de solución acuosa de sulfato de amonio 11,94 por ciento (Chemische Febrick Lenkte), cloruro de sodio 0,85 por ciento y azida de sodio 0,1 por ciento y se mezcló con 100 ml de plasma. Se dejó 24 horas en refrigeración y se separó el sobrenadante por filtración (filtro rápido Whatman N° 42).

2. Precipitación de globulinas

Se ajustó la concentración de sulfato de amonio al 23,4 por ciento en el sobrenadante, agregando 100 ml de una solución al 47,7 por ciento de la sal, con agitación constante, durante una hora; se refrigeró durante 24 horas. Se filtró el sobrenadante usando papel de filtro retentivo (Whatman N° 1, 50 cm diámetro), y se ajustó a 30 por ciento de sulfato de amonio agitando por una hora. Se dejó en reposo 24 horas y se filtró de igual

manera que en el paso anterior, procediendo luego a dializar con agua en frío, usando membranas de 2,5 cm de diámetro (Kalle Control 3591/1) con agitación constante. Continuamente se hicieron cambios de agua, hasta que las pruebas de turbidez con cloruro de bario mostraron menos de 0,008 por ciento de sulfatos.

A los sobrenadantes que resultaron de cada paso de precipitación se les determinó la concentración de albúmina y proteínas totales (8,24). Al mismo tiempo, se les practicó una electroforesis de proteínas en acetato de celulosa (Titan III Helena) con bófer de dietil barbituratos, pH 8,6 y tinción con Ponceau, registrando las respectivas fracciones en un densitómetro (Quick Scan, Helena Lab.).

El sobrenadante final rico en albúmina, fue liofilizado y almacenado en refrigeración. El polvo de albúmina se pesa y se diluye luego en solución salina, de acuerdo a la concentración requerida, agregando caprilato de sodio como estabilizador y se esteriliza en un equipo Millipore con filtros de poro 0,22 μm .

b. Obtención de albúmina por fraccionamiento alcohólico.

1. Precipitación de impurezas

Se diluyó 100 ml de plasma bovina en 200 ml de solución salina al 0,85 por ciento y se ajustó el pH a 5,6, usando bófer acetato 0,8 M pH 4,0 y se colocó en un baño a -5°C , agitando por una hora. Lentamente se agregó etanol al 95 por ciento (Merck, Sharp and Dohme Research, Laboratories, West Point, PA 19486, USA), enfriado con anterioridad a -5°C hasta obtener una concentración final de 42 por ciento (v/v).

Se tuvo el cuidado de que la temperatura de la mezcla no sobrepasara los 0°C . Se agitó durante una hora a -5°C , para luego centrifugar a 3000 rpm durante una hora a -5°C . Se descartó el precipitado.

2. Precipitación de albúmina

Utilizando el bófer acetato se ajustó el pH del sobrenadante a 4,8, y se agitó durante una hora a -5°C , dejándose luego en reposo durante 3 horas. Se centrifugó la mezcla a -5°C durante una hora a 3000 rpm.

El precipitado de albúmina se reconstruyó en 20 ml de agua destilada y se liofilizó. El polvo de albúmina se pesa y se reconstituye en solución salina hasta la concentración requerida, agregando caprilato de sodio como estabilizador, se esteriliza en un equipo Millipore en filtros de poro 0,22 μm (Millipore Corp. Bedford, M.A. 07130, USA).

A los sobrenadantes que resultan de cada paso, se les determinó la concentración de proteínas totales, albúmina y electroforesis siguiendo el mismo procedimiento citado para el método de sulfato de amonio.

Resultados

En la purificación de albúmina del plasma bovino, usando alícuotas idénticas para ambos procedimientos, se obtuvo una recuperación del 59 por ciento del fraccionamiento con sulfato de amonio y de 68,5 por ciento para el fraccionamiento etanólico. Por su parte, la pureza del producto final fue de 78,9 por ciento de albúmina para el primer método y de 97,8 por ciento para el segundo, quedando respectivamente un 21,1 por ciento y un 2,2 por ciento de globulinas como impurezas (ver Cuadros 1, 2 y 3).

Los resultados de los análisis electroforéticos se muestran en las Figuras 1, 2 y 3. Para obtener el producto final con el método del sulfato de amonio, deben realizarse tres

fases de precipitación, modificando en cada una la concentración de sal, y descartando en forma paulatina, el máximo posible de globulinas.

El primer paso de precipitación permite eliminar principalmente al fibrinógeno, y una porción pequeña de globulinas. De allí que la concentración de estas baje de 68,4 por ciento en el plasma inicial a 60,2 por ciento en el sobrenadante II cuantificando en el densitómetro (ver Fig. 1, y Cuadro 1). El ajuste de la concentración de sal hasta 23,8 por ciento, en cambio, hace que las globulinas de la solución disminuyan hasta el 19,0 por ciento. Con el ajuste de la concentración de sal al 30 por ciento, disminuyen las globulinas en forma mínima y prácticamente no se detectan en el densitómetro.

Queda una solución final, después de liofilizar, de 78,9 por ciento de albúmina y de 21,1 por ciento de globulinas.

Con el método etanólico, el producto final se obtiene luego de dos pasos de precipitación. Del primero de ellos se obtiene en el sobrenadante una alta proporción de albúmina. 90,2 por ciento que se observa como una banda ancha en la electroforesis, y un 9,8 por ciento de globulinas. Luego de liofilizar el precipitado III, se obtuvo una solución con 97,8 por ciento de albúmina y un 2,2 por ciento de globulinas (ver Fig. 2, Cuadro 2).

El Cuadro 4 muestra, a manera de resumen, las diferencias de los productos finales de ambos métodos respecto a la concentración de electrolitos, pH, concentración de metales pesados y otros.

CUADRO 1
FRACCIONAMIENTO DE PLASMA BOVINO
EN SULFATO DE AMONIO

	% Globulinas*	% Albúmina*
Plasma bovino total	68,4	31,6
Sobrenadante II	60,2	39,8
Sobrenadante IV	19,0	81,0
Sobrenadante VI	21,1	78,9

* Cuantificación electroforética en densitómetro (Quick Scan Helena Lab.).

CUADRO 2
FRACCIONAMIENTO DE PLASMA BOVINO
POR EL METODO ETANOLICO

	% Globulinas*	% Albúmina*
Plasma bovina total	68,4	31,6
Sobrenadante II	9,8	90,2
Precipitado III	2,2	97,8

* Cuantificación electroforética en densitómetro (Quick Scan Helena Lab.).

CUADRO 3
COMPARACION DE LA PURIFICACION DE ALBUMINA BOVINA POR FRACCIONAMIENTO SALINO
(SULFATO DE AMONIO) Y ETANOLICO

	PLASMA INICIAL			PRODUCTO FINAL					
	Vol. (ml)	Prot. tot. (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Vol. (ml)	Prot. tot. (g/dl)	Albúmina (g/dl)	Total (g)	Pureza (%)	Recuper. (%)
Fraccionamiento salino	100	9,3	4,6	205*	1,6	1,3	2,7	78,9	59
Fraccionamiento etanólico	100	9,3	4,6	25**	13,1	12,8	3,2	97,8	68,5

* Sobrenadante rico en albúmina.

** Pasta de albúmina reconstituida.

CUADRO 4
COMPOSICION FINAL DE LA ALBUMINA PRODUCTO DEL
FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO Y
FRACCIONAMIENTO ETANOLICO

	Método sulfato de amonio	Método etanólico
% Pureza	78,9	97,8
pH	7,4	7,4
Sodio (mEq/L)	162	53
Potasio (mEq/L)	4,3	1,7
Cloro (mEq/L)	120	114
Plomo (mg/dl)	5,2	3,1
Magnesio (mg/dl)	19,0	0,2
Calcio (mg/dl)	50,0	1,2
Lípidos totales (mg/dl)	484	50

FIGURA 2
Electroforesis del Fraccionamiento del Plasma Bovino por el Método de Etanol

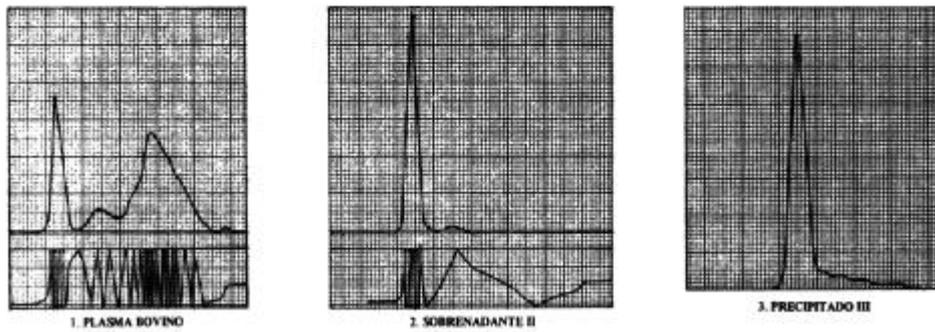
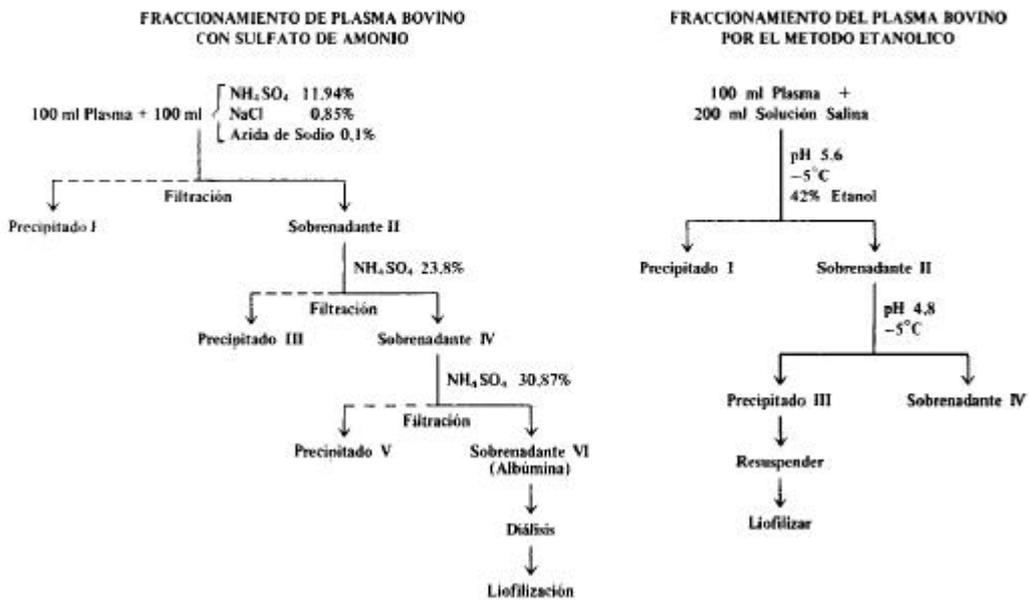


FIGURA 3



Discusión

Las propiedades de las albúminas comerciales usadas en los laboratorios, difieren unas de otras, y estas diferencias se atribuyen al método empleado para su producción; como resultado se dan variantes importantes: la naturaleza y la cantidad de impurezas presentes, la fuerza iónica, el pH y las sustancias unidas a la albúmina tales como iones, lípidos y ácidos grasos.

Se reporta en la literatura (6,9) una diferencia muy marcada en la calidad de la albúmina obtenida por estos dos métodos, en lo que respecta a la pureza y al porcentaje de recuperación para plasma humano, siendo de mayor calidad el producto obtenido por el método de fraccionamiento etanólico.

Algunos autores reportan resultados variables en la calidad de sus productos por otros métodos, que utilizan precipitación con ácido tricloroacético (15), cristalización con sulfato de amonio y ácido acético (9), o en forma óptima la polimerización de la albúmina (12).

El fraccionamiento con sulfato de amonio, pasando por ajustes sucesivos en la concentración de sal y filtraciones entre cada uno de ellos, requieren un equipo y manejo menos estricto, pero el rendimiento, la pureza y el tiempo requerido para completarlo no son del todo satisfactorios para considerarlo como una alternativa primaria en la producción de albúmina bovina.

El fraccionamiento etanólico que según Hao (6), permite lograr una pureza del 98 por ciento, requiere el control estricto de variables críticas como pH, temperatura y concentración de etanol. El resultado de 97,8 por ciento de pureza confirma ese hallazgo, sin embargo la baja recuperación 68,5 por ciento obtenida en la presente experiencia bien podría deberse a tales variables, en vista de que el equipo empleado debe diseñarse al efecto para regular principalmente la temperatura a - 5 °C, cosa difícil de lograr sin los medios y condiciones adecuados.

Se debe hacer notar que desde el primer paso de precipitación en este método etanólico, la pureza lograda es alta 90,2 por ciento. Queda por definirse si para uso en inmunohematología resulta indispensable la segunda parte del procedimiento o si bastaría más bien afinar el control de las variables en el primer paso.

En caso de demostrarse que el primer sobrenadante (Fig. 2) con un tratamiento, para ajuste de sus condiciones de pH, osmolaridad y otras, guarda las características mínimas, sin dar reacciones extrañas en las pruebas, la inversión de trabajo, equipo y reactivos, y el costo del producto se verían considerablemente disminuidos. Este deberá tomarse en cuenta en el momento en que una vez perfeccionada la metodología y la técnica, se pretende desarrollar un método útil, sencillo y rentable para producir albúmina bovina en gran escala en el país.

Analizando la composición final de los productos en cuanto al contenido de electrolitos, metales pesados y otros (Cuadro 4), se establece que el obtenido por el método de Hao resulta ser de calidad muy superior y reúne condiciones más adecuadas para su uso en el laboratorio.

Agradecimiento

Queremos agradecer al personal del Instituto Clodomiro Picado, por facilitarnos el equipo y material utilizado, al Lab. de Investigación del H.N.N., y Matadero Nac. de Montecillos por la colaboración brindada.

ABSTRACT

A comparative evaluation of two methods applied to the production of albumin from bovine plasma: Precipitation with ammonium sulfate, and ethanolic fractionation by Hao's method, is presented.

The purpose of this study is to determine the quality of the product obtained from both methods, and to establish which one is better, from an economic point of view, and the general conditions for large scale production.

A recovery of 59 percent and a purity of 78,9 percent of the albumin were observed using the ammonium sulfate method.

Using the ethanolic method, the recovery was 68,5 percent with 97,8 percent of purity.

Therefore, the ethanolic method offers better advantages, because of the larger and higher of purity of the resulting albumin.

Bibliografía

1. American National Red Cross Symposium (Washington). "The development of plasma derivatives for clinical use." *Proceedings. Vox Sanguinis*, 1972; 23:1-151.
2. Cameron, J.W. Diamond. "Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXIX. Serum albumin as a diluent for Rh typing reagents." *J. Clin. Invest.* 1945; 24:793-801.
3. Cohn, E., Strong, E., Hughes, L., Mulford, J., Ashworth, N., *et al*; "Preparation and properties of serum and plasma proteins." *J. Am. Chem. Soc.* 1946; 68:459- 475.
4. Diamond, L.K., Denton, R.L. "Rh agglutination in various media with particular reference to the value of albumins." *J. Lab. Clin. Med.* 1945; 30:821-829.
5. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. "Determination of serum proteins by means of biuret reaction." *J. Biol. Chem.* 1949; 177:751-766.
6. Hao, Yu Lee. "A simple method for the preparation of human serum albumin. *Vox Sang.* 1979; 36:313-320.
7. Jones, J.M. "Influence of polymers on the efficacy of serum albumin as a potentiator of incomplete Rh agglutinins." *Nature.* 1969; 224:508-510.
8. Kabat, E.A. *Inmunoquímica experimental*. Prensa Médica Mexicana, I Edición, México, 1968; 5-167.
9. Kugelmass, N. *Biochemistry of Blood in health and disease*. Edit. Charles C. Thomas, Illinois, 1959; 5-55.
10. Leach, Sydney. *Physical principles and techniques of protein chemistry*. Vol. I, Academic Press, New York, 1969; 369- 495.
11. Neurayh, H. *The proteins*. Vol. III, 2a Ed. Academic Press, 1965; 2-15.
12. Putnam, F.W. *The Plasma Proteins*. Vol. I, 1a. Edic. Academic Press, New York, 1960; 16-128.

13. Reckel, R.P., Harris, J. The Unique characteristics of covalently polymerized bovine serum albumins solutions when used as antibody detection media. *Transfusion*, 1978, 18:397-406.
14. Shultze, L., Heremans. *Molecular Biology of Human Proteins*. Vol. I, 1a Ed. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1966; 236-256.
15. Schwerth, G.W. "Recovery of native bovine serum albumin after precipitation with trichloroacetic and solution in organic solvents." *Nature*, 1945; 79:139-141
16. Tullis, J.M. *Blood cells and plasma proteins, their state in nature*. Academic Press Inc. New York, 1953; 3-403.
17. Wadsworth, A. "Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. E. Williams and Wilkins, Baltimore, 1947; 3-415.
18. Webster, D.A. "An immediate reaction between bromocresol green and serum as measures of albumin content. *Clin. Chem.* 1977; 24:663-665.

FIGURA 1
Electroforesis del Fraccionamiento del Plasma Bovino por el Método de Sulfato de Amonio

