



**Cuba Salud**

IV Convención  
Internacional de Salud  
17-21 de octubre, 2022

## **Determinación de protoporfirina IX eritrocitaria libre por espectrofotometría UV-Visible**

Lic. Talía González Rodríguez<sup>1</sup>

Lic. Javier Taboada González<sup>1,2</sup>

Lic. Julio César Pérez Suarez<sup>1</sup>

Téc. Sonia Álvarez Borrego<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Toxicología, La Habana, Cuba, javiertg8411@gmail.com.

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

### ***Resumen:***

La determinación de protoporfirina IX eritrocitaria libre (PEL) constituye un método rápido, seguro, sensible y económico que permite detectar deficiencias latentes de hierro (Fe), anemia por deficiencia de este metal e intoxicaciones por plomo (Pb). La determinación de la PEL es apropiada, como prueba en la investigación de personal expuesto, El desarrollo de un método espectrofotométrico, como alternativa al método establecido por cromatografía líquida de alta resolución se asume como una prioridad que permita extender y simplificar la realización de estos análisis. Se desarrolló el método utilizando la espectrofotometría visible, la determinación de los estadígrafos se realizó por los programas STATGRAPHICS CENTURIÓN y MICROSOFT OFFICE EXCEL 2013. Se realizó un estudio de montaje y validación, analizando linealidad, precisión, exactitud y costo del procedimiento. Se montó y validó el procedimiento analítico que desde el punto de vista de costos el método constituye una herramienta económica que representa un ahorro considerable de medios y reactivos.

***Palabras clave:*** Espectrofotometría, protoporfirina, plomo.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por plomo y sus efectos potenciales adversos ha sido observada por diferentes países entre ellos Cuba. La presencia de plomo en sangre no es natural, esta produce una lesión bioquímica que da lugar a un aumento de los niveles de Protoporfirina IX eritrocitaria libre. La era industrial trajo consigo enfermedades producidas por el plomo y una de las causas fue que las tuberías de agua potable se construían con dicho metal. En la actualidad, tanto en nuestro país como en el resto de mundo existen oficios donde los obreros se exponen ocupacionalmente al plomo, por lo que es una necesidad determinar el nivel de exposición a dicho metal, mediante determinados estudios que se le realizan a la sangre (1,2).

En el Centro Nacional de Toxicología de Cuba, se determina la concentración en sangre de Protoporfirina IX eritrocitaria libre, la cual constituye un marcador directo para determinar el nivel de exposición a plomo. Sus valores normales oscilan en un intervalo entre 0 – 59  $\mu\text{g/dL}$ . (1) Esta se puede realizar mediante técnicas cromatográficas o fluorimetría; que brindan resultados precisos y con buena sensibilidad. La determinación se efectúa por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de Arreglo de Diodos, pero actualmente este equipo se encuentra fuera de servicio; por lo que para mantener la atención al personal expuesto surge la necesidad de desarrollar una técnica analítica alternativa a la cromatográfica para la determinación de Protoporfirina IX Eritrocitaria Libre.

### I. MÉTODO

Se empleará la espectrofotometría UV – Vis como método analítico, esta técnica utiliza como instrumento de detección el espectrofotómetro. Consiste en la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda por medio de una solución que contiene una cantidad desconocida de analito, y una que contiene una cantidad conocida del mismo analito (patrón); es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas (3,4,5). Se realizará un estudio de validación, para aplicar el método de la curva de calibración.

El equipo a utilizar es un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu), modelo: UV-1800.

### II. RESULTADOS

Para determinar la longitud de onda del máximo de absorción (longitud de onda de trabajo) se obtuvo primeramente el espectro UV – Vis de la protoporfirina IX. Como puede observarse en la figura 1 se encuentra a 405 nm

La tabla 1 muestra el valor de la absorbancia correspondiente a cada patrón. Estas mediciones se realizaron para construir las curvas de calibración correspondientes, para relacionar la señal analítica con la concentración del analito. En este estudio, se realizaron un total de 10 réplicas entre 2 analistas y en días diferentes.

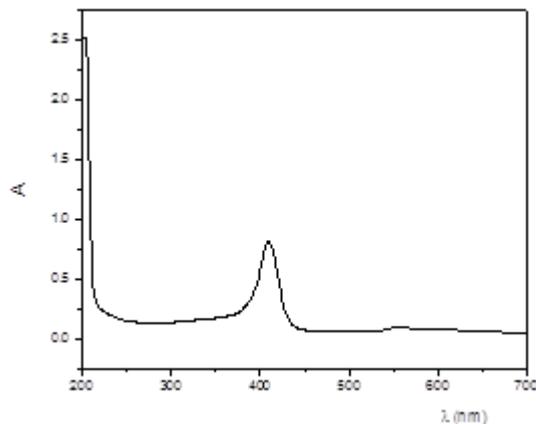


Figura 1: Espectro UV – Vis de la Protoporfirina IX

Tabla 1: Valores de absorbancia correspondientes a cada patrón

Conc ( $\mu\text{g/dL}$ )	Absorbancia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20	0,074	0,068	0,071	0,074	0,074	-	0,067	0,063	0,064	0,065
40	0,152	0,140	0,149	0,150	0,154	0,120	0,138	0,137	0,141	0,14
50	0,198	0,177	0,184	0,188	0,189	0,155	0,173	0,173	-	0,176
60	0,225	0,204	0,217	0,224	0,227	0,206	0,207	0,205	0,203	0,211
80	0,309	0,268	0,293	0,302	0,305	0,278	0,273	0,277	0,271	0,293
100	0,394	0,361	0,369	0,375	0,373	0,349	0,345	0,343	0,361	0,354

Para el estudio de validación del método que se propone desarrollar, se calcularon los estadígrafos: media aritmética (Media), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) y se calculó el intervalo de trabajo para cada patrón.

Tabla 2: Estadígrafos descriptivos

Conc ( $\mu\text{g/dL}$ )	Media	DS	CV (%)	Intervalo de trabajo
<b>20</b>	0,069	0,004	6,510	0,064 – 0,073
<b>40</b>	0,142	0,010	7,002	0,132 – 0,152
<b>50</b>	0,179	0,012	6,912	0,167 – 0,192
<b>60</b>	0,213	0,009	4,458	0,203 – 0,222
<b>80</b>	0,287	0,015	5,323	0,272 – 0,302
<b>100</b>	0,362	0,016	4,359	0,347 – 0,348

A partir de la interpretación y análisis de los estadígrafos calculados, puede apreciarse que en correspondencia con los valores de la media calculados, los valores para la desviación estándar son relativamente pequeños. Esto puede comprobarse además con los valores de CV, que oscilan por debajo del 10%, comportamiento que cumple con el criterios de validación de un método analítico, que establece que el valor del CV debe ser inferior al 15%.

En la figura 2 se muestra la representación gráfica de los valores de las mediciones, donde es apreciable la correspondencia entre las mediciones, lo que se justifica con los valores del coeficiente de variación. Por tanto, resulta evidente de acuerdo con los valores reportados en la tabla 2 que el método tiene una buena precisión y por consiguiente buena reproducibilidad y repetibilidad. En la tabla 2 pueden verse los intervalos de trabajo de cada patrón. Se determinó el intervalo del patrón, que es el intervalo de concentraciones en que las mediciones son confiables. Está dado por la media  $\pm$  DS. Los valores de absorbancia fuera de este intervalo no son confiables.

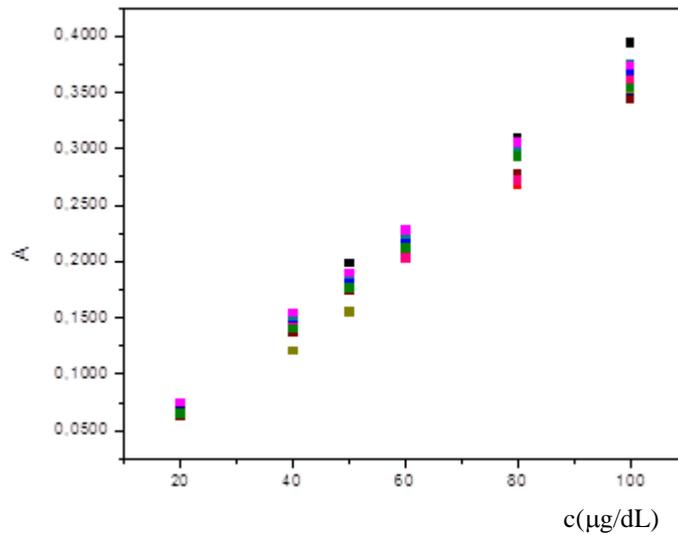


Figura 2: Dispersión de las mediciones realizadas

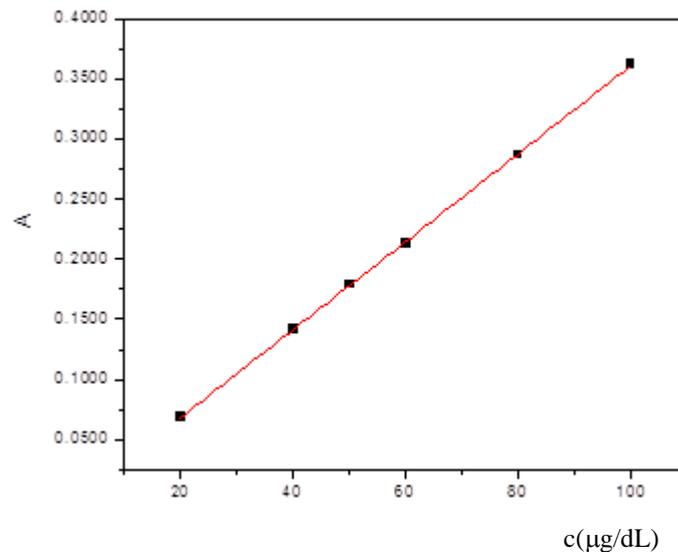


Figura 3: Curva de calibración para la determinación de Protoporfirina IX eritrocitaria libre

Se construyó la curva de calibración para la determinación de Protoporfirina IX eritrocitaria libre. En gráfico 1 dicha curva, donde puede apreciarse la tendencia lineal de las mediciones. Se obtuvo la ecuación de la recta, siendo **a** el intercepto y **b** la pendiente, donde:

$$a = - 0,0046$$

$$b = 0,0037$$

De manera que al sustituir estos valores en la ecuación de una línea recta, obtenemos la ecuación de la curva de calibración:

$$A = 0,0037c - 0,0046$$

Donde:

A: absorbancia

c: concentración másica [ $\mu\text{g}/\text{dL}$ ]

El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de la recta obtenida es 0,9999. Para que un método analítico sea considerado que posee una buena linealidad, el valor de  $r^2$  debe ser mayor que 0,9800, de manera que puede considerarse que el ajuste es lineal y que por tanto, el método también es lineal en el intervalo estudiado; que se encuentra comprendido entre 20 – 100  $\mu\text{g}/\text{dL}$ .

### III. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la ecuación de la curva de calibración.
- Se comprobó el cumplimiento del criterio de linealidad y reproducibilidad del procedimiento desarrollado.
- Se determinaron los estadígrafos descriptivos: DS, CV y el rango de trabajo para cada patrón, quedando demostrada la factibilidad de la determinación cuantitativa de Protoporfirina IX eritrocitaria libre mediante espectrofotometría UV-Visible, lo cual permite restablecer el servicio de atención al personal expuesto e intoxicado por plomo.

### REFERENCIAS

- (1) Klassen Curtis D. Metales pesados y sus antagonistas: En: Harman JG. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman and Gillman. 9<sup>ed</sup>. México: Me Graw-Hill Interamericana; 1996.p. 1755 - 1761.
- (2) Método práctico para determinar protoporfirina libre eritrocitaria como marcador biológico ante la exposición a plomo inorgánico. <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/297>.
- (3) Método práctico para determinar protoporfirina libre eritrocitaria como marcador biológico ante la exposición a plomo inorgánico. <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/297>.
- (4) Brunatti, C; Martín, A. «1 Introducción a la Espectroscopia de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano». Consultado el 10 de mayo de 2015.
- (5) Libro: Métodos modernos de análisis químico, por, Robert L. Pecsok y L. Donald Shields, Editorial Limusa, 1983.