

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ALGUNS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (APLICÁVEIS AO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO)

Lucia Mary Singer VERMES *
Rubens Guimarães FERRI *
José Maria MARLET **

RIALA6/430

VERMES, L.M.S.; FERRI, R.G. & MARLET, J.M. — Estudo comparativo entre alguns métodos de determinação de proteínas totais (aplicáveis ao líquido cefalorraqueano). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:11-16, 1977.

RESUMO: Quatro métodos para determinação de proteínas totais aplicáveis ao líquido cefalorraqueano foram comparados quanto à sensibilidade, exatidão, precisão e consumo de fluido. Os métodos estudados foram: turbidimétrico pelo ácido tricloracético, colorimétrico após tratamento das soluções protéicas com os reagentes cupro-alcálico e de Folin-Ciocalteu (método de Lowry), turbidimétrico pelo ácido sulfossalicílico e o colorimétrico do eluato do material protéico previamente depositado em tiras de acetato de celulose e tratado com corante específico para proteínas (método de Heer & Margni). No cômputo geral o método de Lowry revelou-se o mais adequado dos quatro procedimentos estudados para determinação de proteínas totais de fluidos biológicos diluídos. Este método mostrou-se superior aos outros procedimentos no que concerne à sensibilidade, exatidão e consumo de fluido.

DESCRITORES: líquido cefalorraqueano; proteínas totais, métodos de determinação.

INTRODUÇÃO

Doenças do sistema nervoso central são muito freqüentemente acompanhadas de aumento do teor protéico do líquido cefalorraqueano (LCR), e o conhecimento deste teor tem, muitas vezes, valor diagnóstico.

Até hoje, no entanto, não se acham padronizados os níveis de proteínas totais do LCR considerado normal. Este problema decorre, em grande parte, da falta de homogeneidade na escolha do método de determinação de proteínas; assim, enquanto já se acha estabelecido universalmente que os métodos que utilizam o reagente do biureto são os mais adequados para medir o teor protéico do soro, os autores que estudam as proteínas do LCR

freqüentemente encontram dúvidas na seleção da metodologia a adotar.

No intuito de escolher a conduta ideal a ser tomada para efetuar determinações da proteinorraquia total, têm sido realizados vários estudos comparativos entre as metodologias existentes; no entanto, a diversidade de conclusões a que chegaram os diferentes pesquisadores é apreciável; para facilitar a avaliação deste fato, acham-se resumidos na tabela I deste trabalho alguns daqueles métodos.

Propusemo-nos, por isto, a comparar a sensibilidade, precisão e exatidão de alguns métodos de determinação de proteínas totais (aplicáveis a fluidos biológicos diluídos) para, baseados em tais dados, escolhermos aquele

* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, S.P.

** Do Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, S.P.

procedimento que melhor satisfizesse estes critérios e aplicá-lo futuramente em estudos sobre as proteínas do LCR.

A seleção dos métodos a serem estudados foi baseada principalmente na facilidade de emprego em laboratórios, hospitais e institutos que rotineiramente devem efetuar quantificações de proteínas totais em amostras de LCR; assim, por exemplo, eliminamos *a priori* os métodos espectrofotométricos que utilizam luz ultravioleta e o método do biureto, segundo GOA⁶, por exigirem aparelhagem especial que, nem sempre, é encontrada nos laboratórios de rotina. O método de Kjeldahl, sem dúvida o que apresenta melhor precisão e exatidão, tem a desvantagem de ser trabalhoso e consumir demasiado tempo e volume de fluido.

Os métodos baseados na precipitação das proteínas e subsequente leitura do volume precipitado após centrifugação, apesar de não exigirem aparelhagem sofisticada e serem de fácil manipulação, foram descartados deste estudo porque, ao que se depreende da literatura, não são precisos nem exatos (fatos estes previsíveis pelo tipo de leitura destes métodos)^{1, 11}.

Foram então selecionados e comparados quatro métodos: o turbidimétrico após precipitação das proteínas pelo ácido tricloracético (TCA), o colorimétrico segundo LOWRY *et alii*¹², o turbidimétrico após tratamento da solução protéica com ácido sulfossalicílico (ASS) e o colorimétrico preconizado por HEER & MARGNI¹.

TABELA 1

Estudos comparativos entre métodos de determinação de proteínas totais do líquido cefalorraqueano

Autores (ano)	Métodos comparados	Método padrão de referência	Método de escolha
SPINA-FRANÇA <i>et alii</i> ¹³ (1951)	Turbidimetria pelo ASS Turbidimetria pelo TCA Biureto Reação xantoprotéica	Kjeldahl	Turbidimetria pelo TCA
EGGSTEIN & KREUTZ ⁵ (1955)	Biureto Lowry modificado Reação xantoprotéica	Kjeldahl	Lowry modificado
CARTIER & PICARD ⁴ (1957)	Biureto Espectrofotometria por luz UV Turbidimetria pelo ASS Lowry	Kjeldahl	Lowry
BURTIN <i>et alii</i> ⁵ (1958)	"Volumétrico" Turbidimetria pelo TCA Biureto Biureto após precipitação das proteínas	Kjeldahl	Biureto após precipitação das proteínas
RIEDER ¹⁹ (1958)	Turbidimetria pelo ASS Reação xantoprotéica Lowry modificado Espectrofotometria por luz UV	Kjeldahl	Lowry modificado
RICE & LOFTIS ¹⁸ (1962)	Biureto Turbidimetria pelo TCA	Johnston & Gibson	Turbidimetria pelo TCA
KLUGE <i>et alii</i> ¹² (1968)	"Volumétrico" Nefelometria pelo ASS	Lowry	Nefelometria pelo ASS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Soluções protéicas

Após ter sido conferida a excelente exatidão do método do biureto segundo GORNALL *et alii*⁷, quando aplicado a determinações de proteínas totais do soro²⁵, quantificamos por este método o teor protéico de uma mistura de amostras de soro humano normal.

A partir desta mistura de soros, foram efetuadas diluições cuidadosas em solução fisiológica, de modo a serem obtidas 6 soluções (SP) com diferentes conteúdos protéicos, quais sejam: SP1 — 98,60 mg/100 ml; SP2 — 58,00 mg/100 ml; SP3 — 46,00 mg/100 ml; SP4 — 32,87 mg/100 ml; SP5 — 25,00 mg/100 ml; SP6 — 12,32 mg/100 ml.

Estas SP foram utilizadas nos experimentos sobre reprodutibilidade, exatidão e sensibilidade dos métodos de determinação de proteínas totais.

2. Método turbidimétrico pelo TCA

Realizado segundo a técnica de BOSSAK *et alii*² modificada por SPINA-FRANÇA & AMAR²², utilizando espectrofotômetro "Coleman Jr."

3. Método turbidimétrico pelo ASS

Padronizado segundo a técnica de MEULEMANS¹⁴, utilizando espectrofotômetro "Coleman Jr.". Este método no entanto revelou-se pouco sensível (para ser aplicado ao LCR), pois foi verificado, ao ser construída a curva-padrão, que somente consegue determinar valores maiores que 27,5 mg/100 ml.

4. Método de Lowry

Realizado utilizando os reagentes cupro-alcálico e de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por LOWRY *et alii*¹⁸. A colorimetria foi feita em espectrofotômetro "Spectronik 20" no comprimento de onda de 630 nm.

5. Método de Heer & Margni

Realizado utilizando tiras de acetato de celulose gelatinizado, corante Ponceau-S diluído em TCA, ácido acético e espectrofotômetro "Coleman Jr.", conforme técnica descrita por HEER & MARGNI⁶.

Foi observado, ao ser construída a curva-padrão, que a sensibilidade do método é muito baixa (para nossos propósitos), pois só determina valores de proteínas maiores que 40 mg/100 ml.

6. Análise estatística

Cada SP foi submetida a 20 determinações de proteínas totais, sendo 10 efetuadas pelo

método turbidimétrico após precipitação das proteínas pelo TCA, e 10 pelo método de Lowry.

Avaliamos a precisão de cada procedimento pelo coeficiente de variação de Pearson, expresso em porcentagem.

A exatidão de cada método foi avaliada pelo cálculo em porcentagem da diferença média entre as concentrações encontradas e as concentrações reais.

RESULTADOS

Os resultados das determinações de proteínas totais das 6 SP, efetuadas pelos métodos de Lowry e turbidimétrico pelo TCA, acham-se na tabela 2, assim como as médias e desvios-padrão obtidos.

As precisões dos métodos turbidimétrico e colorimétrico, calculadas pelo coeficiente de variação de Pearson, foram, respectivamente, de 4,18 e 4,86%.

Os resultados dos cálculos de exatidão mostraram que o método de Lowry apresenta, em média, valores 7,38% superiores e o método turbidimétrico valores 11,15% inferiores aos reais.

DISCUSSÃO

Os métodos de determinação de proteínas totais aplicáveis ao LCR devem apresentar certas características básicas, quais sejam: sensibilidade, precisão, exatidão, fácil aplicação em laboratórios de rotina, pequeno consumo de fluido, independência da relação albumina/globulina e especificidade para proteínas.

Dos quatro métodos de determinação de proteínas totais, escolhidos por serem relativamente simples e não exigirem aparelhagem sofisticada, sendo portanto de fácil aplicação em laboratórios de rotina, dois deles (o turbidimétrico pelo ASS, segundo MEULEMANS¹⁴ e o colorimétrico de HEER & MARGNI⁶) revelaram-se pouco sensíveis para nossos propósitos, pois somente conseguem determinar teores protéicos maiores de 27,5 e 40,0 mg/100 ml, respectivamente. Por isto estes dois métodos foram excluídos dos estudos sobre precisão e exatidão.

O método turbidimétrico pelo TCA apresenta boa sensibilidade pois, com 1 ml de fluido podem ser determinados conteúdos protéicos de 12,48 e 3,87 mg/100 ml para transmitâncias de 80 e 90%, respectivamente.

O método de Lowry apresenta excelente sensibilidade: em apenas 0,4 ml de solução protéica, podem-se determinar valores de

TABELA 2

Resultados das determinações de proteínas totais, efetuadas pelos métodos turbidimétrico pelo TCA e de Lowry et alii¹⁵ nas seis diferentes soluções protéicas

Conteúdos protéicos reais *	Determinações de proteínas totais efetuadas pelo método turbidimétrico após tratamento das amostras com TCA											Determinações de proteínas totais efetuadas pelo método de Lowry													
	mg/100 ml											\bar{X}	D.P.	mg/100 ml											\bar{X}
98,60	84,24	86,72	88,00	86,72	86,72	88,00	91,94	86,72	91,94	89,28	88,03	2,44	108,14	108,14	108,14	106,55	99,50	106,20	109,77	97,23	108,14	100,26	105,21	4,46	
58,00	57,05	57,90	57,90	55,39	55,39	53,28	52,06	53,28	57,05	57,05	55,72	1,96	62,39	67,27	61,19	63,59	61,19	66,03	60,03	63,59	58,86	62,39	62,65	2,58	
46,00	43,29	42,60	42,60	43,29	41,23	40,21	42,60	41,23	44,00	40,21	42,13	1,33	49,37	48,61	50,91	46,38	50,13	48,61	50,91	50,91	51,68	50,91	49,84	1,61	
32,87	31,13	29,96	28,80	30,54	29,96	31,72	28,80	34,75	32,91	31,72	31,03	1,85	33,94	34,46	31,91	35,52	37,68	34,99	37,68	37,68	33,94	35,52	35,33	1,92	
25,00	21,04	22,77	21,73	22,25	23,31	25,45	23,31	23,31	22,77	21,04	22,70	1,32	27,68	28,84	28,26	28,55	29,02	30,92	28,09	28,55	28,09	27,68	28,57	0,94	
12,32	8,47	7,61	8,05	8,47	8,91	8,47	8,91	8,05	11,57	8,91	8,74	1,08	12,99	11,61	11,89	11,89	12,72	12,44	12,72	12,72	12,16	11,35	12,25	0,55	

* Obtidos a partir de diluições de soro humano normal cujo teor protéico foi previamente determinado pelo método do biureto, segundo GORNALL et alii⁷.

proteínas totais de 7,04 e 2,53mg/100 ml, correspondentes, respectivamente, a transmissâncias de 80 e 90%.

A precisão da turbidimetria pelo TCA (4,18%) revelou-se ligeiramente superior àquela do método de Lowry (4,86%).

Quanto à exatidão, o método turbidimétrico fornece valores que, em média, são 11,15% inferiores aos reais, enquanto que a colorimetria de soluções protéicas, após tratamento com os reagentes cupro-alcálico e de Folin-Ciocalteu, oferecem valores que em média são 7,38% mais elevados que os reais.

Apesar da precisão superior do método turbidimétrico, julgamos mais vantajosa a técnica descrita por LOWRY *et alii*²², dada sua maior sensibilidade, boa exatidão e baixo consumo de fluido para efetuação de determinações protéicas.

No entanto deve-se ter em mente que tanto o método turbidimétrico, pelo TCA, como o

método de Lowry apresentam senões: o primeiro por ser dependente da relação albumina/globulina como verificado por vários autores^{9, 10, 16, 21} e o segundo por sofrer interferências de drogas quando ministradas em altas doses, como observado por RIEDER²⁰, PASHLEY *et alii*¹⁵ e ZONDAG & BOETZLAER²⁸.

CONCLUSÃO

Concluimos que, no cômputo geral, o método de Lowry é o mais adequado dos quatro procedimentos em questão (turbidimetria pelo TCA, turbidimetria pelo ASS, método de Heer & Margni e método de Lowry), para determinação de proteínas totais de fluidos biológicos diluídos (especialmente LCR).

Este método revelou-se superior aos outros procedimentos, no que concerne à sensibilidade, exatidão e consumo de fluido.

RIALA6/430

VERMES, L.M.S.; FERRI, R.G. & MARLET, J.M. — Comparative study of methods for determining total protein (in cerebrospinal fluid). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:11-16, 1977.

SUMMARY: Four procedures for determining total protein in diluted biological fluids (specifically cerebrospinal fluid) were compared as to accuracy, precision, sensibility and fluid consumption. The methods investigated were: trichloroacetic acid turbidimetric method, colorimetry of the protein solutions previously treated with alkaline-copper and Folin-Ciocalteu reagents (Lowry's method), the sulphosalicylic acid turbidimetric method, and the procedure devised by Heer & Margni in which colorimetry is done on the eluate of the protein solution previously applied to a cellulose acetate strip and dyed. In an overall view, Lowry's method proved to be the most suitable for routine determinations of total proteins in diluted biological fluids because of its higher accuracy, sensibility and lower amount of liquid required.

DESCRIPTORS: cerebrospinal fluid; total protein, methods for determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, H. & ANGELSTEIN, I. — Zur Methodik der Gesamtweissbestimmung im Liquor. *Klin. Wochr.*, 30: 277-9, 1952.
2. BOSSAK, H.N., ROSENBERG, A.A. & HARRIS, A. — A quantitative turbidimetric method for the determination of spinal fluid protein. *J. vener. Dis. Inform.* 30: 103-3, 1949.
3. BURTIN, P.; DOUTRIAUX, D. & POCLDALO, J.J. — Contribution a l'étude de la protéinorachie. Intérêt de la méthode du biuret. *Presse méd.*, 66: 413-6, 1958.
4. CARTIER, P. & PICARD, J. — Étude comparée de quelques méthodes récentes de dosages des protéines dans les liquides biologiques. *Ann. Biol. clin.*, 15: 459-68, 1957.
5. EGGSTEIN, M. & KREUTZ, F.H. — Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweissbestimmung im Liquor und eiweissarmen Lösungen. *Klin. Wochr.*, 33: 879-84, 1955.
6. GOA, J. — Microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 5: 218-22, 1953.

7. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.*, 177: 751-66, 1949.
8. HEER, E.E. & MARGNI, R.A. — *Electro e immunoelectroforesis: manual de laboratorio e interpretaciones fundamentales*. Buenos Aires, Gumersindo F. Fernandez, 1971. p. 269-76.
9. HENRY, R.J. — *Clinical chemistry: principles and technics*. 3rd. ed. New York, Harper & Row, 1965. p. 173-253.
10. HENRY, R.J.; SOBEL, C. & SEGALOVE, M. — Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 92: 748-51, 1956.
11. KIRK, P.L. — The chemical determination of proteins. *Advanc. Protein Chem.*, 3: 139-67, 1947.
12. KLUGE, H. von; WINKLER, G. & WIECZOREK, V. — Ergebnisse aus Vergleichen verschiedener Methoden zur Bestimmung des Gesamtproteins in Liquor cerebrospinalis. *Dtsch. Gesundheitswes.*, 23: 2039-41, 1968.
13. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-75, 1951.
14. MEULEMANS, O. — Determination of total protein in spinal fluid with sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid. *Clin. chim. Acta*, 5: 757-61, 1960.
15. PASHLEY, D.H.; SCHUSTER, G.S.; PALMER, P. & SHARAWY, M.M. — Some drugs and other substances that interfere with protein determination. *Clin. Chem.*, 19: 263-65, 1973.
16. PLUM, C.M.; HERMANSEN, L. & PETERSEN, I. — Fractionated protein determination on small quantities (C.S.F., urine, serum dilution). *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 7(Suppl. 18): 3-35, 1955.
17. RICE, E.W. — Total proteins in cerebrospinal fluid (Turbimetric). *Stand. Meth. clin. Chem.*, 2: 231-36, 1965.
18. RICE, E.W. & LOFTIS, J.W. — Critique of the determination of proteins in cerebrospinal fluid. Evaluation of the biuret method of Goa and the TCA-turbidimetric method of Meulemans. *Clin. Chem.*, 8: 56-61, 1962.
19. RIEDER, H.P. — Vergleich einiger Methoden zur Bestimmung des Gesamteiweißes im Liquor und anderen stark verdünnten Lösungen. *Clin. chim. Acta*, 3: 455-70, 1958.
20. RIEDER, H.P. — Eine neue Modifikation der Cu-Folin-Methode zur Bestimmung des Total-proteins im Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wschr.*, 44: 1036-40, 1966.
21. SETHNA, S. & TSAO, M.U. — Protein level in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 3: 249-56, 1957.
22. SPINA-FRANÇA, A. & AMAR, I. — Valores normais da concentração protéica do líquido cefalorraquidiano: variações ligadas ao local de colheita da amostra. *Arg. Neuro-psiquiat.* (S. Paulo). 19: 220-25, 1961.
23. SPINA-FRANÇA, A.; CERQUEIRA, F.M.C. & AMAR, I. — Proteinorraquia. Estudo crítico de métodos de dosagem. *Arg. Neuro-psiquiat.* (São Paulo), 13: 303-12, 1955.
24. SVENSMARK, O. — Determination of protein in cerebrospinal fluid. A comment on the Lowry method. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 10: 50-2, 1958.
25. VERMES, L.M.S. — *Proteínas totais do líquido cefalorraqueano: métodos de determinação e níveis normais (variações ligadas ao sexo, idade e local de punção)*. São Paulo, 1975. [Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]
26. ZONDAG, H.A. & BOETZELAER, G.L. — Determination of protein in cerebrospinal fluid. Sources of error in the Lowry method. *Clin. chim. Acta*, 5: 155-6, 1960.

Recebido para publicação em 19 de março de 1976.