

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**



**PURIFICACION DE ALBUMINA HUMANA UTILIZANDO  
CAPRILATO DE SODIO**

**HEIDI KLINCKWORT GUERRERO**

**ELVIRA ADRIANA RAMOS LARIOS**

**Q. F. B. BIOQUIMICO MICROBIOLOGO**

**1 9 7 9**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

TESIS 1979  
AÑO M. E. 18  
PERSONA \_\_\_\_\_  
PROF. \_\_\_\_\_  
C. \_\_\_\_\_



PROCESOS DE ALBUMINA HUMANA UTILIZANDO

CLORURO DE SODIO

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS

DE ALBUMINA HUMANA

DE LA BIBLIOTECA NACIONAL

PRESIDENTE = Ma. Luisa García Padilla  
VOCAL = Victoria Valles Sánchez  
SECRETARIO = Ma. Dolores Lastra Azpilicueta  
1er. SUPLENTE = Guadalupe Leticia Carrasco  
2do. SUPLENTE = José Luis Domínguez Torix

Sitio donde se desarrolló el tema:

" INDUSTRIAS BIOLÓGICAS MEXICANAS " , S. A.

Nombre del sustentante: HEIDI KLINCKWORT GUERRERO

ELVIRA ADRIANA RAMOS LARIOS

Nombre del asesor del tema: Q.F.B. MA. LUISA GARCIA PADILLA

Nombre del supervisor técnico: I.B.Q. EDUARDO PEÑA MARTINEZ

D E D I C A T O R I A S

A NUESTROS PADRES

CON AGRADECIMIENTO POR  
SU VALIOSA AYUDA, A:  
I.B.Q. EDUARDO PEÑA M.

A JAAN

# I N D I C E

- I            O B J E T I V O
- II           I N T R O D U C C I O N
  - 1. Generalidades
  - 2. Proteínas Sanguíneas
  - 3. Historia y Objetivos del Fraccionamiento de Sangre.
  - 4. Principios de Fraccionamiento de Proteínas
  - 5. Producción a Gran Escala
  - 6. Aspecto Bioquímico
  - 7. Síntesis de Albúmina en el Hígado
  - 8. Funciones de la Albúmina
- III          M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S
  - 1. Electroforesis
  - 2. Determinación de Proteínas Totales
  - 3. Determinación de pH

IV            R E S U L T A D O S

V             C O N C L U S I O N E S

VI            R E S U M E N

VII           B I B L I O G R A F I A

I     O B J E T I V O

I

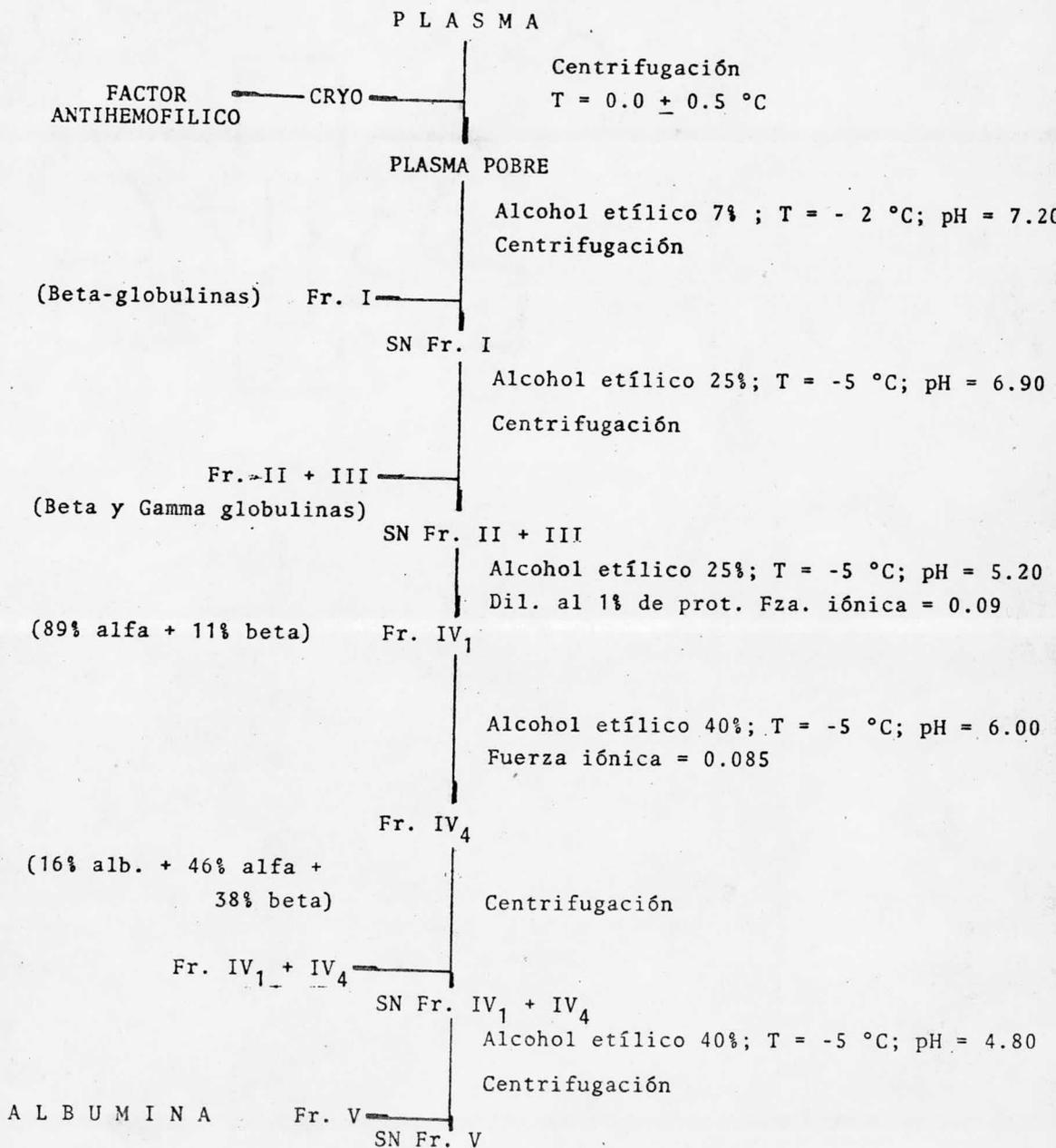
## O B J E T I V O

El método más comúnmente utilizado para el fraccionamiento de plasma, consiste en aprovechar las diferencias de solubilidad de las distintas proteínas, en presencia de disolventes no polares a pH específicos. (2 )

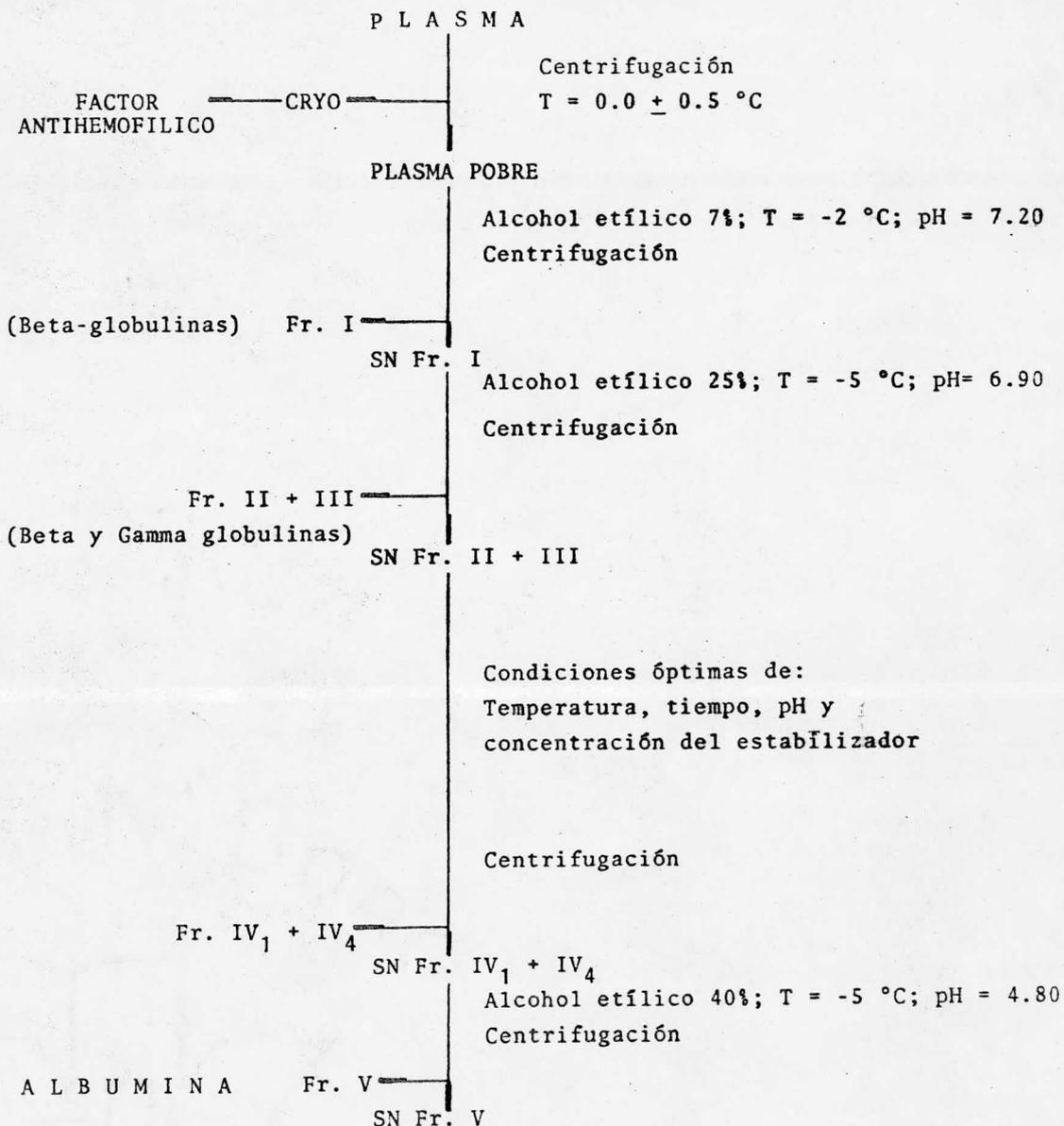
El presente trabajo tiene como objetivo determinar las condiciones óptimas para la purificación de albúmina humana, utilizando la sal sódica del ácido octanóico como estabilizador y calentando para desnaturalizar las impurezas, manteniendo en solución solamente la albúmina. (10 )

En el siguiente esquema se presenta el método propuesto por Cohn para el fraccionamiento de plasma, que es el más utilizado y la alternativa que se sugiere.

## M E T O D O D E C O H N



A L T E R N A T I V A   P R O P U E S T A



II    I N T R O D U C C I O N

## II

## I N T R O D U C C I O N

## 1) Generalidades

La sangre es un líquido de vital importancia para el organismo ya que todas las partes del cuerpo humano están bañadas por ella; además es el vehículo líquido por el cual los más importantes de los nutrientes orgánicos son transportados desde el intestino, en donde son absorbidos, al hígado en donde son procesados y posteriormente llevados a otros órganos; también a través de ella los productos de desecho y el exceso de iones minerales son llevados a los riñones para su excreción.

La sangre también es el vehículo para transportar el oxígeno de los pulmones a los tejidos y mediante ella se lleva a cabo la eliminación del dióxido de carbono generado durante la respiración, el transporte de hormonas y otros mensajeros químicos desde varias glándulas endócrinas hacia sus órganos blancos.

El sistema vascular humano contiene de 5 a 6 litros de sangre; cerca de la mitad de su volumen consiste en: células rojas - (eritrocitos) los cuales transportan oxígeno y un poco de dióxido de carbono, en menor cantidad células blancas (leucocitos) y plaquetas.

La otra parte que no contiene células es llamada plasma sanguíneo, el cual es un líquido amarillento con un pH de 7.4 y con un contenido de diferentes solutos orgánicos e inorgánicos (carbonatos, fosfatos y cloruros). (12). Aproximadamente 3/4 partes de estos solutos son proteínas que desempeñan importantes funciones por lo cual tienen un gran valor terapéutico, ya que una o varias pueden faltar bajo determinadas circunstancias. Por ejemplo: la albúmina se pierde por traumatismos, por algunas enfermedades del riñón o debido a que por ciertos disturbios hepáticos no se produce.

En muchas ocasiones por diversas razones se hace necesaria la aplicación de transfusiones sanguíneas.

Estas son usadas terapéuticamente para tratamientos de anemia.

resultantes de enfermedades o hemorragias, tratamiento en la pérdida de proteínas del plasma, tratamiento de enfermedades en las cuales no se conserva un nivel adecuado de proteínas, inmunización pasiva y en el tratamiento de la hemofilia. Las transfusiones pueden ser hechas de una persona a otra en forma de sangre completa o plasma, en este caso se utilizan citratos para evitar la coagulación. En caso de ser administrada sangre completa, son necesarias pruebas preliminares de compatibilidad, por esta razón es mejor utilizar plasma en casos de emergencia.

Cuando se ha perdido sangre completa, por hemorragias severas lo único que puede reemplazarla es sangre completa del mismo tipo de la del receptor. (22 ).

## 2) Proteínas Sanguíneas

Las proteínas son el 20% del volumen total de la sangre y se presentan asociadas con la mayoría de los procesos fisiológicos que ella efectúa. El plasma contiene el 10% en peso de

sólidos, de los cuales 7 a 9% son proteínas, un 1% de sales y el resto de sustancias lipídicas y otros materiales.

Estos últimos casi siempre se encuentran adheridos a una molécula protéica.

Los grupos de proteínas son: fibrinógeno, albúminas y globulinas, éstas últimas se dividen por su movilidad en el campo eléctrico en = alfa , beta y gamma . (22 )

En la Tabla I se encuentran algunas características de estas proteínas así como sus funciones.

Otras proteínas encontradas en el plasma son las enzimas como: plasmina, peptidasa, estearasa sérica, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, colesterol estearasa, lipasa, amilasa, lisozima y transferrina.

También se encuentran lípidos asociados a la fracción protéica de alfa-globulinas entre los que están: colesterol, carotenos, vitamina A, estriol, hormona adrenocorticoide,

vitamina D, vitamina E, ácidos grasos de cadena larga como  
el ácido oléico, etc.

T A B L A I  
DIFERENTES PROTEINAS DEL PLASMA ( 10 )

C L A S E	CONCENTRACION mg %	PESO MOLECULAR	F U N C I O N
ALBUMINA SERICA	3,000 a 4,500	68,000	REGULACION OSMOTICA TRANSPORTE DE ACIDOS GRASOS, BILIRUBINA, ETC.
d <sub>1</sub> GLOBULINAS	100	40,000 a 55,000	TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS ( 27 )
α <sub>1</sub> LIPOPROTEINAS	350 a 450	200,000 a 400,000	TRANSPORTE DE LIPIDOS.
α <sub>2</sub> GLOBULINAS	400 a 900		
α <sub>2</sub> Glicoproteínas		hasta 800,000	TRANSPORTA Y SOLUBILIZA CARBOHIDRATOS ( 27 ).
Ceruloplasmina	30	150,000	TRANSPORTE DE COBRE
Protombina		63,000	COAGULACION DE LA SANGRE.
β GLOBULINAS	600 a 1,200		
β <sub>1</sub> Lipoproteínas	350 a 450	3 a 20 millones	TRANSPORTE DE LIPIDOS ( 27 )
Transferrina	40	85,000	TRANSPORTE DE FIERRO
Plasminógeno		90,000	PRECURSOR DE FIBRINOLISIA.
γ GLOBULINAS	700 a 1,500	160,000	ANTICUERPOS ( 4 )
FIBRINOGENO	300	340,000	COAGULACION DE LA SANGRE

3) Historia y objetivos del fraccionamiento de sangre:

Desde hace muchos años la sangre completa fue usada para transfusiones. La efectividad del plasma fue demostrada al final de la Primera Guerra Mundial, aunque presentaba problemas de estabilidad y empaque. Posteriormente se conocieron métodos para liofilizarlos y así los problemas de esterilidad y estabilidad desaparecieron, además, que podría ser almacenado por más tiempo.

En ese entonces se desarrollaron técnicas para la preparación de plasma líquido a gran escala.

Al iniciarse la Segunda Guerra Mundial, aumentó la demanda de transfusiones de sangre y se inició la experimentación para satisfacer dicha demanda.

La restitución de la albúmina es necesaria en caso de shock, pero no así la administración junto con ella del resto de las proteínas plasmáticas, por lo que se hizo favorable el fraccionamiento del plasma. ( 22)

En ese tiempo, aproximadamente una quinta parte de la sangre recolectada por la "Cruz Roja Americana", era transformada a derivados del plasma por fraccionamiento. (20 )

En 1941 E.J. Cohn lleva a cabo la primera preparación de albúmina humana que es probada terapéuticamente en Julio del mismo año.

En 1942 se inicia la construcción de plantas a gran escala y en 1943 se hacen los primeros suministros a la marina.

Posteriormente se prestó atención a las diferentes fracciones independientemente de la albúmina y se desarrollaron técnicas para la purificación de gamma-globulina suministrando los primeros materiales en 1944. (22 )

#### 4) Principios de fraccionamiento de proteínas:

Las proteínas son macromoléculas, constituidas por polipéptidos formados a su vez por muchas unidades diferentes llamadas

aminoácidos. Son sustancias que se alteran fácilmente en forma irreversible por el calor, ácidos fuertes o álcalis y otros agentes desnaturizantes. Por ésto solamente pueden utilizarse algunos métodos para purificarlas.

Todos los métodos de fraccionamiento utilizan las diferencias de solubilidad para hacer posible la separación de soluciones acuosas.

Las condiciones para la separación son las siguientes:

- 1 - Una alta solubilidad de un componente (entre 1 y 10 g por litro ), cuando la mayoría de los componentes del sistema tienen baja solubilidad o
- 2 - Una baja solubilidad de un componente ( entre 0.01 y 0.1 g por litro), cuando la mayoría de los componentes tienen altas solubilidades.

Estas variables deben controlarse exactamente para obtener diferencias suficientes en solubilidad y por lo tanto una separación precisa.

El obtener la fase sólida depende de las condiciones de precipitación.

Los métodos existentes para el fraccionamiento de proteínas hacen uso de las siguientes:

- . el aumento de la polaridad mediante la adición de sales.
- . la disminución de la polaridad por disolventes orgánicos.
- . el control de pH para acercar la proteína a su punto isoeléctrico. (22)

En el primer caso se utiliza la propiedad de las proteínas de reducir su solubilidad conforme se adicionan grandes cantidades de sales. Cuando se utilizan disolventes orgánicos de constante dieléctrica baja (acetona y alcohol) , las proteínas cambian su configuración de tal forma que su solubilidad disminuye en agua. Si la adición es a temperaturas suficientemente bajas , la desnaturalización se evita aunque esta adición no conduce a una sepa-

ración total. (5), (6), (7), (9), (13), (17), (28), (29), (30).

Al acercar las proteínas a su punto isoeléctrico, se llega al estado de menor solubilidad caracterizado por un valor de pH específico para cada proteína.

En el fraccionamiento de plasma se utilizan cinco variables fundamentales.

- 1 - pH de 4.4 a 7.4
- 2 - Fuerza iónica de = 0.001 a 0.160
- 3 - Concentración de alcohol etílico en fracción mol de = 0.00 a 0.163 ( 0 a 40% en volumen a 25 °C)
- 4 - Concentración de proteínas de = 0.2 a 66 g/l
- 5 - Temperatura de = 0 a -10 °C

El método más utilizado para el fraccionamiento de proteínas es el método de Cohn 6, 9. (8) (22).

Aunque este método ha sido utilizado con éxito en el fraccionamiento de plasma a gran escala, presenta algunos inconvenientes económicos que vienen a ser importantes cuando el volumen de plasma procesado es mayor de 3,000 litros mensuales; debido a que se utiliza una cantidad considerable de alcohol y se requiere mayor tiempo de centrifugación. Esto ha conducido a algunos investigadores, fundamentalmente a la búsqueda de un método más económico para la separación de albúmina, estabilizándola con ácidos grasos de cadena larga en bajas concentraciones o con acetil D-L triptofano, evitando la desnaturalización a temperaturas elevadas. ( 10).

En la ausencia de estabilizadores, al calentar el plasma, se forma un nuevo componente por la interacción de la albúmina y la globulina, con una movilidad electroforética intermedia entre la beta-globulina y la albúmina. Estas investigaciones condujeron a determinar que al adicionar estabilizadores al plasma, la albúmina no intervenía en la formación de ese componente y podría ser recuperada en un paso si se utilizaban las diferencias de solubilidades entre la albúmina no desnaturalizada y las globulinas

das naturalizadas por el calor, obteniéndose una pureza electroforética entre 92 y 98%.

Se ha intentado obtener albúmina estable al calor variando las condiciones en el método de Cohn.

En uno de estos métodos se obtiene albúmina con rendimientos muy bajos (30). En el otro método se trata de disminuir el efecto adverso del alcohol en la estructura proteica de la albúmina aunque esto solo tiene fines de investigación. Con el mismo objeto se ha tratado de utilizar electrodiálisis y precipitación con polietilenglicol (31), (32), (33), (34).

#### 5) Producción a gran escala:

Para la producción a gran escala deben considerarse los siguientes puntos:

- 1 - Evitar el crecimiento microbiano y sus productos.
- 2 - Minimizar las alteraciones irreversibles de las proteínas iniciales.
- 3 - El sistema de precipitación deberá producir un

tamaño de partícula suficiente para evitar la inversión de grandes tiempos en la separación.

- 4 - Compatibilidad de todos los reactivos utilizados con la aplicación terapéutica de los productos.
- 5 - Obtención en forma estable y reproducible.

Es necesaria una limpieza escrupulosa que permita manejar márgenes de seguridad satisfactorios, debido a que existe el riesgo de introducir sustancias pirogénicas en los productos para uso intravenoso. Por lo tanto para el proceso y la limpieza del equipo debe utilizarse agua destilada libre de pirógenos.

6) Aspecto bioquímico:

La albúmina es una molécula soluble en agua e insoluble en soluciones salinas concentradas. La solubilidad de la mayoría de las proteínas está dada por la fuerza iónica, el pH y la concentración de disolventes orgánicos.

Al ser la fuerza iónica muy baja la mayoría de las proteínas sufren el fenómeno de "salado"(salting in), o sea permanecen en solución, al aumentar la fuerza iónica las proteínas se vuelven insolubles, fenómeno al cual se le llama "desalado" (salting out).

El fenómeno de "desalado" observado a fuerzas iónicas altas, es probablemente el resultado de la competencia entre la proteína y los iones de sales por las moléculas de agua disponibles en el medio; por lo tanto, a concentraciones suficientemente altas de sales hay insuficiencia de moléculas de agua disponibles para la disolución completa de la proteína y las interacciones proteína-proteína se vuelven más importantes que las interacciones agua-proteína y por lo tanto precipitan.

El pH también desempeña un papel muy importante en la solubilidad de las proteínas. Estas precipitan cuando están en su punto isoeléctrico y se ha explicado este fenómeno basándose en que las repulsiones electrostáticas intermoleculares se encuentran en este punto minimizadas por lo que las moléculas interaccionan entre sí y flocculan.

La mayoría de los disolventes orgánicos se pueden utilizar para precipitar las proteínas. Al aumentar la concentración del disolvente orgánico, disminuye la capacidad de los disolventes acuosos de solubilizar a los grupos cargados en la proteína. (15)

A la molécula de albúmina se le denomina proteína completa ya que se caracteriza por tener una cantidad relativamente grande de todos los aminoácidos incluyendo esenciales y no esenciales. Tabla II.

Por tener esta característica de proteína completa, representa una reserva móvil de aminoácidos.

Cuando se almacena la albúmina tiende fuertemente a polimerizarse en dímeros, trímeros y otras variedades que pueden dar lugar a reacciones menores en caso de administración intravenosa. (14).

## T A B L A I I

COMPOSICION DE AMINOACIDOS EN LA ALBUMINA  
( 25)

( g DE AMINOACIDO EN 100 g DE PROTEINA)

Glicina .....	1.60
Serina .....	3.70
Treonina .....	5.00
Prolina .....	5.10
Valina .....	7.70
Isoleucina .....	1.70
Leucina .....	11.90
Fenilalanina.....	7.80
Tirosina .....	4.66
Triptofano .....	0.19
Cistina / 2 .....	5.58
Cisteína .....	0.70
Metionina .....	1.28
Acido aspártico .....	10.40
Acido glutámico .....	17.40
Arginina .....	6.15
Histidina .....	3.50
Lisina .....	12.30

7) Síntesis de albúmina en el hígado:

Se ha comprobado mediante varios experimentos, que el hígado es el sitio de formación de la mayor cantidad de albúmina, globulinas y fibrinógeno.

Tarver y Reihardt (23), hicieron un estudio sobre la formación de las proteínas plasmáticas y de otros tejidos utilizando metionina marcada con  $S^{35}$ .

Debido a que la metionina es un constituyente de las proteínas de los tejidos, la proporción y grado de incorporación a estas proteínas se utiliza para aclarar la síntesis de las mismas.

Tales investigadores inyectaron la metionina radioactiva a perros normales y a hepatectomizados determinando la proporción de la incorporación a las proteínas de los tejidos y a las fracciones de globulinas, albúmina y fibrinógeno del plasma.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1) Los perros normales y hepatectomizados incorporaron metionina a las proteínas de sus tejidos en la misma proporción, demostrando que varios tejidos extrahepáticos sintetizan sus propias proteínas.
- 2) La metionina radiactiva no apareció en el fibrinógeno del plasma de los animales hepatectomizados, demostrándose así que el hígado es el único responsable de la formación de fibrinógeno.
- 3) Basándose en las proporciones de metionina incorporada a la albúmina y proteínas plasmáticas, los animales normales formaron albúmina 20 veces y globulinas 7 veces más rápido que los animales hepatectomizados. La síntesis de albúmina en los animales hepatectomizados resulta problemática, pues al separarla contiene una pequeña cantidad de globulinas.

Analizando estas premisas podemos concluir, que el hígado sintetiza todo el fibrinógeno, esencialmente toda la albúmina y en parte las globulinas del plasma.

8) Funciones de la albúmina:

La importancia de las proteínas plasmáticas reside entre otras, en la función de regular la distribución de los flujos entre la sangre y los tejidos, es decir regula la presión osmótica.

La albúmina produce cerca del 75 al 80% del efecto osmótico de las proteínas plasmáticas totales ya que tiene un peso molecular muy bajo en comparación de las demás (69,000 en comparación de 170,000 de otras proteínas), y es la que se encuentra en mayor cantidad. (11)

Las moléculas pequeñas del plasma y del líquido intersticial tales como glucosa, aminoácidos, urea y sales difunden libre

mente a través de los capilares sanguíneos y ejercen la misma presión osmótica total en ambos fluidos; sin embargo, las proteínas del plasma y del líquido intersticial no pueden atravesar libremente las paredes de los capilares y como la concentración de proteínas es mucho mayor en el plasma que en el líquido tisular, la presión osmótica del plasma es mayor que la presión osmótica de la linfa. Esta diferencia entre estas dos presiones osmóticas está calculada y es de 25 mm de Hg y representa la presión osmótica efectiva o presión osmótica del plasma.

La distribución del fluido entre la sangre y los tejidos es regulada por el balance entre la presión sanguínea que tiende a forzar el líquido hacia los tejidos, y la presión osmótica efectiva del plasma, la cual tiende a extraer el líquido del espacio intersticial.

En el extremo arterial del capilar la presión sanguínea es de aproximadamente 35 mm de Hg y la presión osmótica de las proteínas es de 25 mm de Hg, o sea existe una diferen-

cia de 10 mm de Hg a favor de la presión hidrostática o sanguínea que permite por filtración o difusión, que salga el líquido del capilar hacia el espacio intersticial. En el extremo venoso del capilar la presión sanguínea baja a unos 10 mm de Hg y la diferencia de 15mm de Hg está a favor de la presión osmótica que tiende a introducir líquido de los espacios intersticiales hacia el capilar. Debido a que la sangre corre a través de este capilar, y por lo tanto la presión sanguínea baja, asimismo baja a su vez la fuerza con la que empuja el líquido hacia afuera.

Llega a existir un punto en el capilar, en el cual la presión sanguínea y la presión osmótica de las proteínas se iguala y el líquido no fluye en ninguna dirección.

Después de este punto la presión osmótica aumenta progresivamente hasta ser mayor que la presión sanguínea y el líquido entra de los tejidos al capilar.

Este movimiento de fluidos se incrementa en el extremo venoso del capilar en donde la diferencia entre la presión osmótica y la presión sanguínea es la máxima.

La fracción de la albúmina contribuye normalmente en un 80% en la presión osmótica efectiva de plasma. Se ha demostrado que cada gramo de albúmina mantiene 18 ml del fluido en el torrente sanguíneo debido a su efecto osmótico. La importancia de esta proteína reside en la capacidad tan grande de mantener la presión osmótica y el fluido en el plasma, así por ejemplo, en caso de trauma el volumen circulante de la sangre puede disminuir, provocando insuficiencia tanto en el corazón como en la función de los tejidos. La aplicación intravenosa de albúmina es lo más efectivo para restablecer y mantener así el volumen del fluido del sistema vascular.

Para estos propósitos, 100 ml de una solución al 25% de albúmina son tan efectivos como 500ml de plasma completo.

Cuando la presión osmótica del plasma baja como consecuencia de la disminución de la concentración de las proteínas plasmáticas, una excesiva cantidad de fluido pasará hacia los tejidos provocando turgidez y un edema.

( 26)

La albúmina tiene la característica de formar complejos con una gran variedad de sustancias. Estas incluyen tanto a aniones como a cationes de muchos colorantes ácidos y básicos, ácidos grasos, aminoácidos acetilados, lípidos, vitaminas, sales biliares, hormonas, etc.

Es por la formación de estos complejos, por lo que la albúmina desempeña un papel tan importante como medio de transporte. ( 14)

Es interesante notar que muchos de estos complejos, particularmente aquellos formados con aminoácidos acetilados incrementan notablemente la estabilidad de la albúmina y la resistencia a desnaturalizarse debido a calor u otros agentes. ( 10)

III

MATERIALES Y METODOS

### I I I M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

- 1) Electroforesis: en acetato de celulosa (Método de Kohn) (21)

#### A - Aparatos

- 1 - Fuente de poder (Camag)
- 2 - Celda para electroforesis (Millipore XC2100015)
- 3 - Aplicador de muestras (Millipore XC2100025)
- 4 - Densitómetro y Registrador (Millipore XE2000050)
- 5 - Membranas de acetato de celulosa (Millipore - ESWM 031 OR)

#### B - Reactivos

- 1 - Colorante de Ponceau (Millipore XE000002B)
- 2 - Buffer de barbital (Millipore XE2100042)  
pH = 8.6 Fuerza iónica = 0.075
- 3 - Solución de enjuague: Acido acético 5:95 p/v  
(Baker 9507)
- 4 - Solución deshidratante: Alcohol etílico absoluto  
(Baker 9000) —
- 5 - Solución clarificadora: Mezcla de acetato de etilo (Baker 1720) y Acido acético glacial (Baker 9507) 30:70 p/v.

C - Procedimiento

- 1 - Verter aproximadamente 30 ml de los reactivos en diferentes recipientes en el siguiente orden:  
Recipiente #1 : Solución buffer  
Recipiente #2 : Colorante de Ponceau  
Recipiente #3 : Solución de enjuague  
Recipiente #4 : Solución deshidratante  
Recipiente #5 : Solución clarificadora
  
- 2 - Introducir la membrana a la solución buffer con la ayuda de unas pinzas.
- 3 - Llenar la celda electroforética con solución - buffer.
- 4 - Colocar la membrana dentro de la celda.
  
- 5 - Colocar con una pipeta Pasteur una gota de las muestras a probar en diferentes pedazos de Para film.
  
- 6 - Utilizando el aplicador tomar la muestra y aplicarla sobre la membrana por un minuto. Si la -

muestra contiene menos de 5% de proteínas, se hace la aplicación las veces necesarias para al canzar esta concentración.

7 - Conectar la celda a la fuente de poder a un vol taje de 100 volts con una corriente de 1.5 mili ampers y dejarla correr por 15 minutos.

8 - Colocar la membrana en el colorante por 10 minu tos.

Lavar la membrana con la solución de enjuague, - dejar secar la membrana al aire o en una estufa a 60°C máximo.

9 - Sumergir la membrana en la solución deshidratan- te por 5 minutos y después colocarla en la solu- ción clarificadora por 1 minuto; finalmente se deja secar en una estufa ventilada de 40 a 60°C por 5 minutos.

10 - Leer la membrana en el densitómetro y graficar.

2) Determinación de Proteínas Totales:

Método de Biuret

A) Aparatos

- 1 - Espectrofotómetro Colleman 44
- 2 - Celdas Colleman

B) Reactivos

- 1 - Reactivo de Biuret

19.2 g de tartrato de sodio y potasio (Baker 3262).

4.8 g de sulfato de cobre (Baker 1843), disueltos en 50ml de agua destilada.

1.0 g de cloruro de potasio (Baker 3162)

612 ml de hidróxido de sodio (Baker 3722) 2.5 N

Aforar a 2 litros con agua destilada.

- 2 - Solución salina al 0.9% (cloruro de sodio 0.15M) (Baker 3625).

C) Procedimiento

- 1 - Ajustar la muestra por dilución a que el contenido de proteínas oscile entre 0.1 y 0.5%.

- 2 - Tomar alícuotas de 1.0, 2.0 y 3.0 ml de esta so  
lución y llevarlas a 5ml con solución salina.
- 3 - Agregar 5ml de reactivo de Biuret.
- 4 - Mezclar por inversión y dejar reposar por 30 mi  
nutos a temperatura ambiente.
- 5 - Leer absorbancia en el espectrofotómetro a 555nm.
- 6 - Calcular la concentración en mg/ml utilizando el  
coeficiente de extinción  $E = 30$ .

3) Determinación de pH

A) Aparatos

Potenciómetro Corning Modelo 7

B) Reactivos

Solución buffer pH = 4.0 (Corning 477070)

C) Procedimiento

- 1- Se enjuagan los electrodos con agua destilada.  
Se secan sin frotar.
- 2- Se introducen en el buffer pH = 4.0 para calibrar el aparato.
- 3- Se secan los electrodos, se enjuagan, y se secan sin frotar.
- 4- Se estabiliza la muestra a una temperatura de 25°C y a una concentración de proteínas del 1%.
- 5- Se introducen los electrodos a la muestra, se gira el botón de la posición de "stand by" a "pH" y se espera a que se estabilice la aguja.
- 6- Se toma la lectura en la escala.

IV   R E S U L T A D O S

#### I V R E S U L T A D O S

Algunos autores han observado que los factores que intervienen en la estabilización de la albúmina son: pH, temperatura, tiempo de tratamiento y tipo de estabilizador. (10)

En este trabajo se fueron modificando estas condiciones para determinar cuáles eran las óptimas.

Se observó el efecto de los siguientes estabilizadores: caprilato de sodio 0.01 M , acetil D-L triptofanato de sodio 0.02M, y la mezcla de ambos (caprilato de Na 0.02M + acetil D-L triptofanato de sodio 0.04,; 1:1)

El método consistió en tratar alícuotas ( 9 ml) de sobrenadante de la separación de gamma-globulinas del plasma, con 1ml de solución de cada uno de los diferentes estabilizadores, calentando a las temperaturas seleccionadas.

Después de este calentamiento fue necesario disminuir el

pH a 4.5 con ácido clorhídrico 0.1 N para precipitar las globulinas, centrifugar y en el sobrenadante determinar proteínas y efectuar electroforesis.

Con estos datos se calculó purificación y % de recuperación de la siguiente manera:

$$\text{Purificación} = \frac{\text{Pureza electroforética} \times \text{Proteínas finales}}{\text{Pureza electroforética} \times \text{Proteínas iniciales}}$$

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Proteínas finales}}{\text{Proteínas iniciales}} \times 100$$

Proteínas iniciales = 3.1 g

Las variables seleccionadas fueron las siguientes:

- 1 - Temperaturas: 50, 55, 60 y 65 °C
- 2 - Tiempos: 1, 1.5 y 2 horas
- 3 - pH : 4.5 , 4.6 , 4.7 , 4.8 y 4.9

A CONTINUACION SE PRESENTAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS

#### EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se realizaron experimentos con diferentes temperaturas 50, 55, 60 y 65 °C, utilizando las tres condiciones de estabilización.

La temperatura de calentamiento se mantuvo constante durante una hora.

En el experimento a 50°C los datos de proteínas más altos pertenecen al tratamiento con la mezcla de estabilizadores, mientras que la pureza electroforética es mayor en el tratamiento con caprilato de sodio.

También puede observarse en la Tabla III que las purificaciones más altas se obtuvieron en el tratamiento a 50°C. De aquí que se seleccionó esta temperatura para realizar los siguientes experimentos.

T A B L A    I I I  
E F E C T O   D E   L A   T E M P E R A T U R A

TEMPERATURA °C	T R A T A M I E N T O	% PROTEINAS EN EL S.N.	% ALBUMINA E.F. EN EL S.N.	% RECUPERACION	PURIFICACION
50	Caprilato	2.12	100.00	68.0	0.88
50	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.17	99.00	70.0	0.90
50	Mezcla	2.32	94.65	74.0	0.91
55	Caprilato	1.80	100.00	58.0	0.75
55	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	1.35	99.00	43.0	0.55
55	Mezcla	1.87	100.00	60.0	0.78
60	Caprilato	1.47	100.00	47.0	0.61
60	Acetil D-L Triptofano de Sodio	0.45	97.00	14.5	0.18
60	Mezcla	1.42	100.00	45.0	0.59
65	Caprilato	0.30	100.00	9.6	0.12
65	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	0.17	87.50	5.4	0.06
65	Mezcla	0.30	77.27	9.6	0.09

#### EFECTO DEL TIEMPO

Habiéndose seleccionado la temperatura óptima que fue de 50°C, se probaron las condiciones de estabilización a diferentes tiempos= 1.0, 1.5 y 2.0 horas.

Los datos presentados en la Tabla IV indican que el tiempo de tratamiento no altera en forma notable los valores de purificación y recuperación y como las condiciones del proceso requieren el menor tiempo posible, en los siguientes experimentos se utilizará una hora.

T A B L A I V  
E F E C T O D E L T I E M P O

TIEMPO HS.	TRATAMIENTO	% PROTEINAS EN EL S.N.	% ALBUMINA E.F. EN EL S.N.	T = 50 °C	
				% RECUPERACION	PURIFICACION
1.0	Caprilato	2.02	100.00	65.3	0.84
1.0	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.17	99.00	70.0	0.90
1.0	Mezcla	2.02	100.00	65.3	0.84
1.5	Caprilato	2.00	100.00	64.0	0.83
1.5	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.02	100.00	65.3	0.84
1.5	Mezcla	2.02	100.00	65.3	0.84
2.0	Caprilato	2.10	100.00	67.0	0.87
2.0	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.10	100.00	67.0	0.87
2.0	Mezcla	1.95	100.00	62.0	0.81

#### EFEECTO DEL pH

En los experimentos realizados anteriormente el pH fue ajustado a 4.5, utilizando una solución de ácido clorhídrico 0.1 N después de haberse llevado a cabo el tratamiento para lograr una floculación completa del resto de las proteínas.

Habiendo obtenido la temperatura y el tiempo óptimos de 50°C y una hora respectivamente, se diseñaron una serie de experimentos cambiando el pH a 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9 después del tratamiento, para determinar las condiciones óptimas de floculación, observándose que mientras más se aumenta el pH, la recuperación y la purificación aumentan.

También es notable la similitud de los resultados obtenidos en el tratamiento con caprilato de sodio y la mezcla de estabilizadores, mientras que el acetil D-L triptofanato de sodio presenta valores menores, (Tabla V).

Con estos resultados se pensó en la posibilidad de ajustar el pH antes del calentamiento para facilitar las condiciones

del proceso. Los datos se presentan en la Tabla VI.

Se utilizaron los valores de pH de 5.0, 5.5 y 6.0, encontrándose que los valores más altos de recuperación y purificación se presentan en los tratamientos con caprilato de sodio y la mezcla de estabilizadores a un pH de 5.0 .

T A B L A V  
E F E C T O   D E L   " p H "

T = 50 °C  
t = 1 H

pH	T R A T A M I E N T O	% PROTEINAS EN EL S.N.	% ALBUMINA E.F. EN EL S.N.	% RECUPERACION	PURIFICACION
4.5	Caprilato	2.12	100.00	68.0	0.88
4.5	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.17	99.00	70.0	0.90
4.5	Mezcla	2.32	94.65	74.0	0.91
4.6	Caprilato	2.10	100.00	67.7	0.87
4.6	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.10	100.00	67.7	0.87
4.6	Mezcla	2.10	98.00	67.7	0.86
4.7	Caprilato	2.25	99.00	72.5	0.93
4.7	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.15	100.00	69.3	0.90
4.7	Mezcla	2.25	100.00	72.5	0.94
4.8	Caprilato	2.25	97.00	72.5	0.91
4.8	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.17	99.00	70.0	0.90
4.8	Mezcla	2.25	97.00	72.5	0.91
4.9	Caprilato	2.30	99.00	74.1	0.95
4.9	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.25	98.00	72.5	0.92
4.9	Mezcla	2.22	99.00	71.6	0.92

T A B L A V I  
E F E C T O D E L " p H "

T= 50 °C

t= 1 H

pH	TRATAMIENTO	% PROTEINAS EN EL S.N.	% ALBUMINA E.F. EN EL S.N.	% RECUPERACION	PURIFICACION
5.0	Caprilato	2.25	100.00	72.5	0.94
5.0	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	1.65	100.00	53.2	0.69
5.0	Mezcla	2.17	100.00	70.1	0.91
5.5	Caprilato	2.15	100.00	69.3	0.90
5.5	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	2.13	100.00	68.7	0.89
5.5	Mezcla	2.13	100.00	68.7	0.89
6.0	Caprilato	2.14	100.00	69.0	0.89
6.0	Acetil D-L Triptofanato de Sodio	1.20	100.00	38.7	0.50
6.0	Mezcla	2.10	100.00	67.7	0.87

V C O N C L U S I O N E S

V CONCLUSIONES

- 1 - El desarrollo experimental muestra, en las Tablas III, IV, V, VI, que las condiciones en las que se obtuvieron mejores resultados son:

Temperatura = 50°C

Tiempo de tratamiento = 1.0 h

pH = 5.0 (ajustándolo antes del calentamiento )

Estabilizador = Caprilato de sodio 0.01 M

- 2 - Debido a que la molécula de albúmina puede fijar ácidos grasos de cadena corta, no es desnaturalizada por el calor y permanece en solución, mientras que las globulinas son desnaturalizadas.

La albúmina puede recuperarse en forma estable y en mayor proporción a partir del sobrenadante de la centrifugación.

- 3 - Al comparar los resultados de las tablas III, IV, V y VI con los datos obtenidos en 9 lotes de fabricación normal

por el método de Cohn 6,9 (Tabla VII), se observa que la recuperación proteica y la purificación casi duplican su valor ( 168 y 165% respectivamente ) en el tratamiento con caprilato.

Esto indica que teóricamente podría obtenerse un rendimiento de dos veces el normal al utilizar este método.

El obtener la albúmina en estas condiciones es de suma importancia por la utilidad que posee esta proteína; ya que 100 ml de una solución al 25% son tan efectivos como 500 ml de plasma.

## T A B L A V I I

NO. LOTE	Kg PROTEINAS		% ALBUMINA E.F.		% RECUPERACION	PURIFICACION
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL		
1	20.880	12.000	64.17	100.00	57.40	0.67
2	22.618	11.280	84.00	100.00	50.50	0.44
3	18.980	13.186	62.00	100.00	69.47	0.58
4	37.848	22.136	89.00	100.00	58.47	0.28
5	31.260	16.200	73.00	98.00	51.82	0.35
6	26.780	15.300	89.00	96.50	57.13	0.41
7	28.837	22.837	76.00	97.00	79.13	0.51
8	23.855	18.250	78.00	98.00	76.58	0.49
9	25.792	19.041	60.00	97.00	73.82	0.65

NOTA: Datos obtenidos de 9 lotes normales fabricados por el Método 6, 9 de Cohn.

En las figuras I, II, III y IV se presenta el análisis electroforético de las etapas que son comunes al método de Cohn y a la alternativa propuesta. Las figuras V y VI comparan el análisis electroforético del precipitado de la fracción V obtenida en ambos métodos.

Figura I



Electroforesis y gráfica de plasma completo, observándose las bandas y curvas correspondientes a: albúmina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y gamma globúlinas.

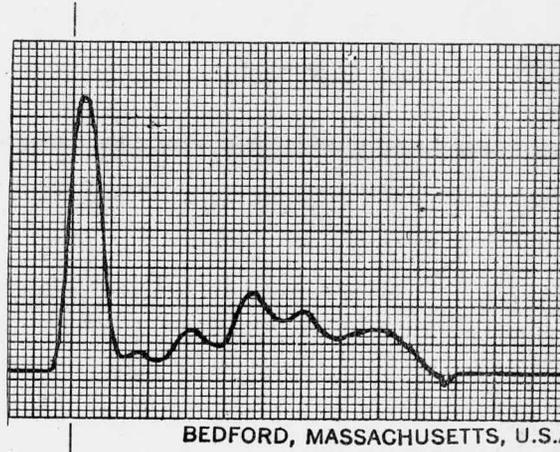


Figura II



Electroforesis y gráfica de plasma pobre.  
(se ha separado el Factor Antihemofílico).



Figura III

Electroforesis y gráfica del sobrenadante de la fracción II + III por el Método de Cohn.  
Se observan las bandas y curvas de albúmina y alfa globulinas.



Figura IV

Electroforesis y gráficas del precipitado de la fracción II + III por el Método de Cohn.  
Se observan las bandas y curvas de beta y gamma globulinas.

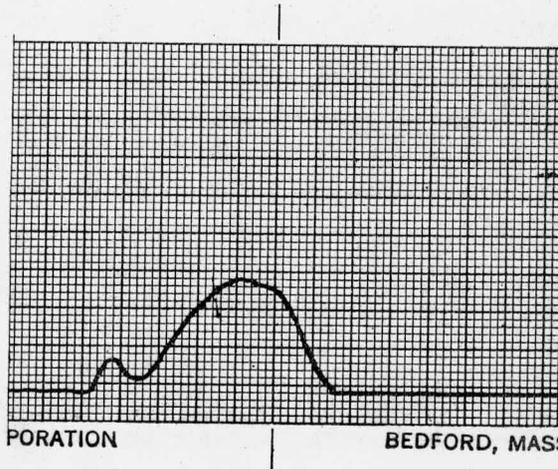


Figura V

Electroforesis y curvas correspondientes al precipitado de la fracción V por el Método de Cohn. Se puede observar una impureza debida a alfa globulinas.

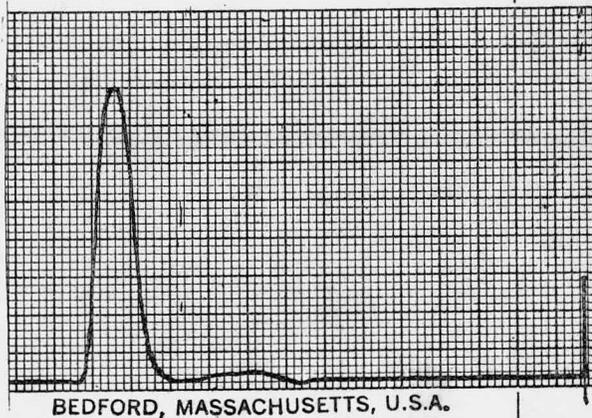
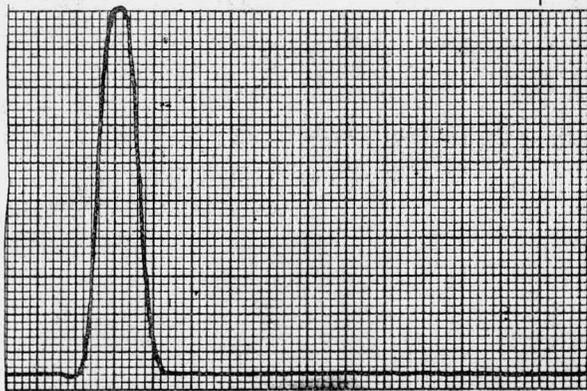


Figura VI

Electroforesis y curva correspondiente al sobrenadante de la fracción IV + IV<sub>4</sub>, obtenida por el Método propuesto. Se observa la albúmina pura.



V I R E S U M E N

VI

R E S U M E N

La molécula de albúmina tiene la propiedad de ser estabilizada contra tratamientos térmicos mediante la fijación de ácidos grasos de cadena corta.

Se realizaron experimentos para determinar las condiciones óptimas en las que se presenta su estabilización, éstas fueron:

Temperatura = 50 °C

Tiempo de estabilización = 1.0 h

pH = 5.0 (ajustándolo antes del calentamiento)

Estabilizador = Caprilato de sodio ( 0.01 M )

En comparación con los resultados obtenidos en 9 lotes elaborados por el método 6,9 de Cohn, la purificación y el % de recuperación casi duplican su valor, lo que ofrece grandes posibilidades para la aplicación a escala industrial de este proceso.

VII BIBLIOGRAFIA

VII B I B L I O G R A F I A

1. Anderson, A.K.  
ESSENTIALS OF PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY.  
4th ed. Jhon - Wiley & Sons Inc., New York 1956, 480 pp.
2. Cohn, L.E., W. Strong, L. Hughes, Jr., D.J., Milford,  
J.N. Ashworth, M. Melin and H.L. Taylor.  
J. AM. CHEM. SOC.  
68, 1946 pp 459-75.
3. Conn, E, y P.K. Stumpf.  
BIOQUIMICA FUNDAMENTAL  
3a Edición,  
Editorial Limusa,  
México 1976 pp 85
4. Enders, J.F.  
J. CLIN INVEST.  
23 1944 pp 510 - 530
5. Felton, L.D.,  
BULL. JOHNS HOPKINS HOSP.  
38 1926 pp 33

6. Felton, L.D.,  
J. IMMUNOL.  
21. 1931 pp 357
7. Felton, L.D.,  
J. IMMUNOL.  
21, 1931 pp 457
8. Felton, L.D.,  
INFECTIOUS DISEASES  
43 1928 pp 543
9. Hardy, W.B., S.J., Gardiner  
PHYSIOL. 40 1910 pp LX Viii
10. Hoch, H., A., Chanutin  
ARCH. BIOCHEM. & BIOPHYSICS  
51, 1954 pp 271 - 76
11. Laguna, J.,  
BIOQUIMICA  
2a ed.,  
La Prensa Médica Mexicana  
México , 1967

12. Lehninger A.  
BIOCHEMISTRY  
2nd Ed.  
North Publ.  
New York, 1976 pp 821 - 835
13. Lin, SC., H. Wu,  
J. PHYSIOL.  
11 1933 pp 315 - 323
14. Lynch J. M.  
METODOS DE LABORATORIO  
2a. Ed.  
Ed. Interamericana  
México 1972 pp 216
15. Mahler, H.R., E.H., Corders,  
BIOLOGICAL CHEMISTRY  
5th , Ed.  
Harper 8 Row  
Tokio, 1969
16. Mazur A., B. Harrow  
TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY  
10a Ed.  
N.B. Saunders Co.  
Philadelphia, 1976 pp 727

17. Mellanley J.  
PROS. ROY SOC.  
London  
1908 pp 380 - 385
  
18. Peterson, W. N., F. M., Strong,  
GENERAL BIOCHEMISTRY  
3a Ed.  
New Jersey 1957, pp 465
  
19. Roitt I.,  
IMUNOLOGIA ESENCIAL  
3a Ed.,  
Editorial JIMS  
Barcelona, 1977 - 317
  
20. Scheinberg, I.H., T.D., Kuiney  
J. AM. MED. ASSOC.  
134 1947 pp 841 - 848
  
21. Schultz H.E., J.F., Heremans,  
MOLECULAR BIOLOGY OF HUMAN PROTEINS  
1st.-,Ed.  
Elsevier Publishing Co., New York 1966

22. Strong, L.E.,  
ENCYCLOPAEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY
23. Thorpe Veale, W. H. Geoffrey B., S.P. James  
BIOQUIMICA  
2a. Ed.  
Compañía Editorial Continental, S.A.  
México 1976  
pp 552
25. Tristram G.R., R.H. Smith,  
PROTEINS, H. NEVRATH. ACADEMIC PRESS,  
New York, 1963 - 46 - 50
26. West & Todd  
TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY  
2nd Ed.,  
Mac Millan Co.  
New York, 1956 - 1356
27. White A., Ph., Handler, E. L. Smith,  
PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY  
4th Ed.  
Mc Graw Hill Book. Company, Koga Kusha  
Tokio 1968 pp 711

28. Wu, H.,  
CHINESE J. PHYSIOL.  
7 1933 pp 125
29. Kistler, P, and H. Nitschmann.  
VOX SANG  
124, 1962, pp 414-424
30. Goch, Halina, Sabalinska, Stanislaw,  
Zakreowski, Kazimierz,  
CENTRALNE LABORATORIUM SUROWIC SZCZEPIONEK  
68, 1973, pp 832
31. Stepanek, Ivan.  
CZECH.  
170, 1977, pp 310
32. Michael S. E.  
BIOCHEM. J.  
82, 1962, pp 212
33. Stern, Harold.  
GER. OFFEN  
2, 1975, pp 519, 909
34. Juckes, I. R. M.  
BIOCHIM. AND BIOPHYS. ACTA  
229, 1971, pp 535-46