
Universidad Autónoma de Guadalajara

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

13
2^o

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

OBTENCION MICROBIOLOGICA, PURIFICACION
E IDENTIFICACION FISICOQUIMICA DE DEXTRANOS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
VERONICA MORENO REYNOSO

Asesor: Q.F.B. Ma. del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JALISCO. 1988.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
CAPITULO 1	2
GENERALIDADES	
1.1).- Definición	3
1.2).- Estructura	4
1.3).- Propiedades del polímero	10
1.3.1).- Propiedades físicas	10
1.3.1.1).- Peso Molecular	10
1.3.1.2).- Solubilidad.....	12
1.3.1.3).- Rotación óptica.....	13.
1.3.1.4).- Rayos X.....	15
1.3.1.5).- Viscosidad.....	13
1.3.1.6).- Forma molecular, flexibilidad y ramificación.....	14
1.3.1.7).- Otras constantes.....	14
1.3.2).- Propiedades químicas	14
1.3.3).- Propiedades bioquímicas	15
1.4).- Actividad fisiológica del Dextrano clínico	15
1.4.1).- Definición	15
1.4.2).- Efectos principales	15
1.4.2.1).- Substituto de Plasma sangui- neo.....	15
1.4.2.2).- Promoción del flujo periférico..	16
1.4.2.3).- Efectos antitrombóticos	19
1.5).- Efectos metabólicos.....	20
1.5.1).- Efectos en circulación, excreción, almacena- miento y metabolismo	20
1.5.2).- Reacciones anafilácticas	22
1.5.2.1).- Antigenicidad	25
1.5.2.2).- Patomecanismo	24
1.5.2.3).- Cambios histológicos	25

1.6).- Usos y aplicaciones.....	26
1.6.1).- Usos industriales	26
1.6.2).- Usos en investigación	27
1.6.3).- Usos clínicos	27
* CAPITULO 2	31
OBTENCION DE DEXTRANOS	
2.1).- Historia.....	32
2.2).- Procesos de obtención	33
2.2.1).- Preparación en el Laboratorio	33
2.2.2).- Fermentación industrial	34
2.2.2.1).- Proceso en breve	34
2.2.2.2).- Proceso en detalle	37
2.2.3).- Síntesis enzimática	41
2.2.3.1).- Proceso en detalle	41
2.2.3.2).- Proceso en breve	41
2.3).- Control de calidad de Dextranos clínicos	44
2.3.1).- Especificaciones	44
2.3.2).- Fases de control	44
2.3.2.1).- Determinación de Peso Molecu- lar.....	45
2.3.2.2).- Determinación de la distribu- ción de los Pesos Moleculares..	45
2.3.2.3).- Control de Esterilidad.....	45
2.3.2.4).- Control de Pirógenos	45
2.3.2.5).- Control Químico	46
CAPITULO 3	47
PARTE EXPERIMENTAL	
3.1).- Objetivos	48
3.2).- Obtención microbiológica	43
3.2.1).- Materiales y reactivos	48
3.2.2).- Método	48
3.3).- Proceso fermentativo	53
3.3.1).- Materiales y reactivos	53
3.3.2).- Método	53

3.4).- Purificación e identificación fisicoquímica del	
Dextrano	55
3.4.1).- Materiales y reactivos	55
3.4.2).- Método	57
3.4.2.1).- Purificación	57
3.4.2.2).- Pruebas fisicoquímicas	57
CAPITULO 4	60
RESULTADOS	
4.1).- Resultados de pruebas bioquímicas y selección del microorganismo <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	61
4.2).- Determinación de tiempo óptimo de fermentación.....	63
4.2.1).- Precipitación	63
4.2.2).- Azúcar reductor	63
4.2.3).- Pruebas de pH	63
4.2.4).- Prueba de control de infrarrojo:.....	66
4.3).- Resultado de rendimiento	67
4.4).- Resultado de absorción de infrarrojo	67
4.5).- Resultado de rotación óptica	67
4.6).- Prueba de viscosidad y Pesos Moleculares	70
CAPITULO 5	74
ANALISIS DE RESULTADOS	
CAPITULO 6	77
CONCLUSIONES	
APENDICE	76
BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUCCION

Los Dextranos ocupan un papel importante dentro de los polisacáridos por su amplia utilización en múltiples áreas científicas, principalmente como substituyente de Plasma sanguíneo o como Fe-Dextrano para el tratamiento de anemia por la deficiencia de éste metal.

Los Dextranos se producen en Suecia, Estados Unidos de Norte America y otros Países, valiéndose de la capacidad de algunos microorganismos, en particular del *Leuconostoc mesenteroides*, en la conversión de Sacarosa a un poliglucósido de diferente Peso Molecular y acomodo de sus enlaces y que se le conoce con el nombre de Dextrano.

La obtención de Dextrano empieza con la obtención de una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de caña de azúcar con la subsecuente fermentación de la Sacarosa utilizando como medio de cultivo materia prima nacional. Seguido de la purificación y secado del producto, que a su vez pasa por una serie de pruebas fisicoquímicas para la rectificación de sus propiedades.

El campo de utilización de los Dextranos es tan amplio que podría -- abrir nuevos procesos de investigaciones dentro de múltiples e importantes sectores de nuestra industria con el mejoramiento de la Economía Nacional, si se implantara en nuestro País una empresa de esta naturaleza.

CAPITULO 1.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

1.1).- Definición

Dextrano es el nombre general que se le da a un gran número de poli-sacáridos obtenidos por diferentes bacterias a partir de la Sacarosa.

Están compuestos casi exclusivamente de unidades de α -D-glucopiranososa, unidas por enlaces 1-6, 1-4, 1-3 y 1-2. (1)

La estructura y propiedades de los Dextranos varían dentro de los rangos sumamente amplios, y dependen de su Peso Molecular. Se le dió el nombre de Dextrano a este grupo por su alta capacidad de dextrorrotación o de girar la luz polarizada hacia la derecha en un orden de $+200^\circ$ (rotación específica). (2)

El Dextrano "Nativo" o crudo (de formación natural) fue observado por primera vez en refinerías de azúcar en forma de masas viscosas y pegajosas que impedían la purificación del azúcar.

Pasteur en 1861 reconoció la formación del Dextrano por acción microbiana. En 1930 Baker y Pederson clasificaron al *Leuconostoc* en dos diferentes especies productoras del Dextrano: *L. mesenteroides* y *L. dextranscum*. Más tarde Hehre reportó la biosíntesis de Dextrano a partir de dextrinas por *Acetobacter viscosum* y *A. capsulatum*. (3)

El microorganismo utilizado industrialmente para la obtención del Dextrano es el *Leuconostoc mesenteroides* con la siguiente clasificación:

Fam: Lactobacillaceae.

Ord: Streptococcaceae.

Gen: *Leuconostoc*.

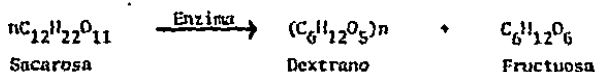
Spe: *mesenteroides*.

Cepa: NRRL B-512 P.

que permite obtener el Dextrano que cumpla con todas las especificaciones para su uso humano.

El primer requisito para la producción del Dextrano es la presencia de Sacarosa en el medio de cultivo para que el *Leuconostoc* pueda utilizar las moléculas de glucosa para la formación del producto, por medio de la enzima llamada Dextrantransferasa (α -1,6-glucan: D fructuosa 2 glucosil transferasa EC 2.4.1.5). (4)

Dada por la siguiente reacción: (5)



1.2).- Estructura.

El Dextrano consiste en largas cadenas de glucosa.

La glucosa, $C_6^{11}O_6$ tiene la estructura conocida en forma de anillo (Fig. 1.1). La mayoría de las unidades en el Dextrano se forman por la pérdida de agua en las posiciones No. 1 y 6, pero existen otras formas de glucosa que se unen en las posiciones 2, 3 y 4.

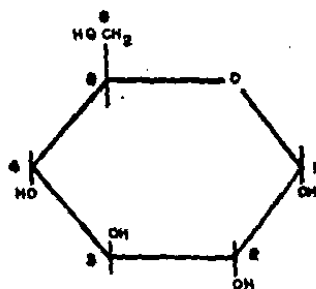


Fig. 1.1 Anillo de alpha-D-glucosa.

La sacarosa está constituida de una unidad de glucosa y una unidad de fructuosa con fórmula general $C_{12}^{11}O_{11}$ (Fig. 1.2). La enzima llamada Dextranasa va rompiendo los enlaces entre glucosa y fructuosa y al mismo tiempo va formando la cadena del Dextrano.

La sacarosa es forzosamente necesaria para la síntesis del Dextrano ya que el *Leuconostoc mesenteroides* no es capaz de sintetizar el compuesto a partir de medio de cultivo que solo contenga glucosa o fructuosa. (6)

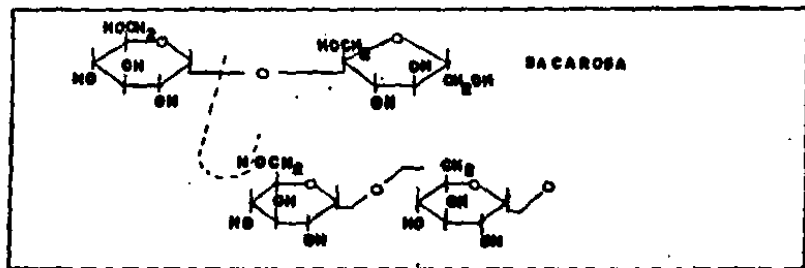


Fig. 1.2 Cadena de Dextrano en formación a partir de sacarosa.

La cadena principal de unidades de α -D-glucosa tiene cadenas laterales que en promedio ocurren según algunos autores cada 10 o 12 unidades de glucosa (7), o cada 20 unidades (8), pero esto es todavía incierto. (Fig. 1.3)

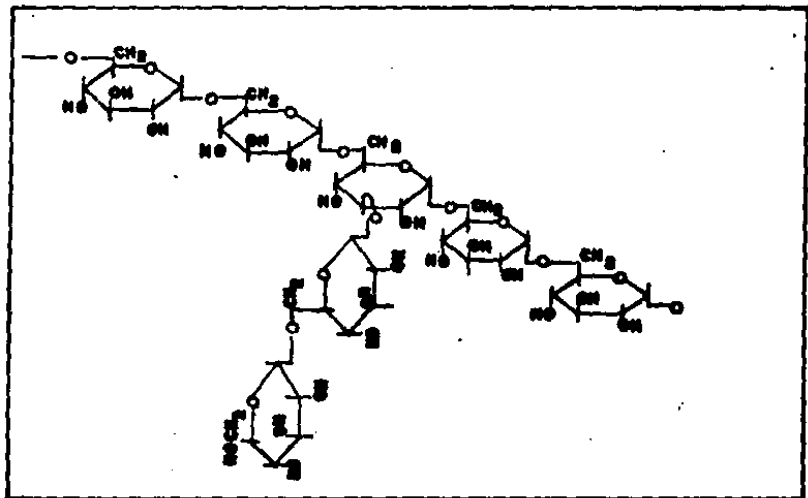


Fig. 1.3 Cadena lineal de Dextrano enlaces 1-6, con ramificación de enlaces 1-3.

Su estructura se ha considerado como coloide lineal (8), con forma de peine, laminar o ramificación en raíz: (9) (Fig. 1.4)

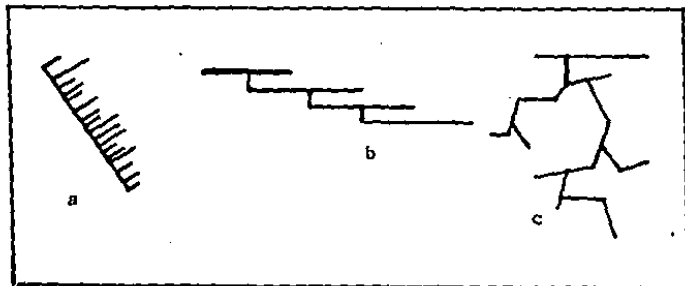


Fig. 1.4. Posibles ramificaciones del Dextrano: a) Peine, b) laminar c) Raíz.

Ya que las soluciones de este compuesto son altamente viscosas, exhiben doble refracción de fluido y los análisis de rayos X indican que las macromoléculas son altamente asimétricas.

El Peso Molecular en los Dextranos varían considerablemente dependiendo de las fracciones precipitadas observadas, del método aplicado, de la cepa utilizada, etc.

En un estudio realizado en 1985 en la Universidad del Estado de Nueva York (10) se observó la estructura molecular y cristalina de Dextranos con difracción de rayos X y electrones, donde se analiza que la forma cristalina del Dextrano tiene acomodo helicoidal y que su estructura no se modifica en sus formas hidratada y anhidra.

Existen otros estudios que concluyen acerca de que el 40% de las cadenas laterales tienen solo un residuo de D-glucosa, que por lo menos un 45% tienen de largo 2 unidades de glucosa y el resto (máx.15%) son mayores de 2 unidades, realizado con Dextrano clínico que es el elaborado industrialmente en Suecia y otros países con la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. (11)

Así como la aplicación de métodos de viscosidad y las ramificaciones obtenidas en Dextrano de cepa B 512 y B 742, el cual comprueba que número de unidades de glucosa en las ramificaciones difiere en número con la pro-

Cedencia del Dextrano. (12)

La mayoría de los enlaces pueden ser entre el Carbono No. 1 y el 6, indicado como 1-6 o pueden ser 1-4, 1-3 y 1-2. Pero existe una clasificación más amplia y clara de como se forman estos enlaces realizada en Estados Unidos de Norte América en 1986 y que nos explica la proporción de estos enlaces según el tipo de cepa de Leuconostoc utilizada. (13)

La siguiente figura muestra las estructuras y símbolos de diferentes enlaces que se dan en los Dextranos. (Fig. 1.5)

El símbolo (1→) se designó al ataque glucopiranosídico de un grupo terminal no reducido (porque el Carbono No. 6 lleva un hidrógeno en su Oxígeno).

El símbolo (6→) designado a una cadena lineal de glucosas unidas por el Carbono No. 6 de una molécula con el Carbono No. 1 de otra.

En los dibujos se pueden observar dos posibilidades en el Carbono No. 6: 1) Si lleva un grupo glucopiranosídico la cadena puede extenderse en una o varias unidades, y 2) si el Oxígeno lleva un hidrógeno entonces es un grupo terminal no reducido.

La letra "l" indica una estructura lineal.

La letra "b" se designa para los enlaces de ramificaciones (branch - point linkage).

La letra "c" que se dá en enlaces 1-3 indica que el mismo tipo de enlaces se repite continuamente.

Las letras "nc" corresponden a no continuidad del mismo enlace dentro de una cadena.

La tabla 1.1 muestra la proporción de enlaces en Dextranos obtenidos de diferentes cepas, tomado del mismo estudio, así actualizando la información con que se contaba anteriormente podemos ver por ejemplo, que el Dextrano obtenido de la cepa B 512 contiene un 90% de enlaces 1-6 un 5% de enlaces 1-3;b, y un 5 % de enlaces 1→, y no como antes se afirmaba que contenía 95% de enlaces 1-6 y el resto de enlaces 1-3. (9)

Por lo tanto podemos concluir que las posibilidades de ramificación y de enlaces son muy considerables y de esto depende el Peso Molecular, las diferencias en solubilidad y las características reológicas de los diferentes Dextranos para así poderlos clasificar en su posible utilización (14), pero recordando que el tipo de cepa formará un Dextrano particular y que puede tener pequeñas o grandes diferencias estructurales con aquellos producidos por otras cepas. (15) (Tabla 1.1)

SÍMBOLO DE ENLACE

ESTRUCTURA DE ENLACE

SÍMBOLO DE ENLACE

ESTRUCTURA DE ENLACE

(1-6)



(1-3; 1n6)



(1-4; 1n6)



(1-3; 1n6)



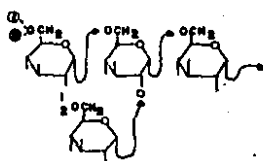
(1-3; 1n6)



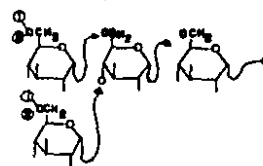
(1-6)



(1-2; b)



(1-4; b)



(1-3; b)

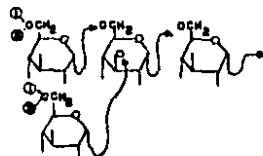


Fig. 1.5 Estructuras y símbolos de enlaces de Dextranos.

Cepa de NRRL No:	Tipos de enlace en porcentaje molar:							
	(1*)	(1-6)	(1-2;b)	(1-2;1,nc)	(1-4;b)	(1-4;1,nc)	(1-3;b)	(1-3;1,nc)
B 512 F	5	90					5	
B 742	38	25			8		28	
B 1254	21	52	2		19	4		1
B 1255	9	82			2		7	1
B 1299	31	32	30	5		1	1	
B 1308	4	91	1				4	
B 1355	10	45					10	35
B 1397	18	66	14				2	
B 1399	29	45	24				2	
B 1402	25	50	22				3	
B 1422	19	62	16				2	
B 1424	22	57	17				4	
B 1420	20	62			17		1	1
B 1526	18	66			14		2	
B 1498	10	51	1				9	29
B 1501	7	60					9	24

Tabla 1.1 Análisis estructural por metilación de Dextranos más frecuentemente usados en estudios inmunológicos. Todas las cepas son de *L. mesenteroides* excepto *L. dextranicum* B-1420; *Streptobacterium dextranicum* B-1254 y B-1255 y *Streptococcus* sp, B-1526.

1.3).- Propiedades del polímero.

Pocas propiedades pueden aplicarse como generales para todos los Dextranos. Pero se puede decir que todos al ser suficientemente purificados son sólidos blancos insípidos; todos muestran una gran rotación óptica positiva; el análisis de absorción de infrarrojos muestran bandas características de unidades de α -D-glucopiranosas con enlaces 1-6 cerca del 917, 840 y 768 cm^{-1} . La mayoría de otras propiedades pueden diferir de acuerdo a la cepa utilizada.

1.3.1).- Propiedades físicas.

La forma se relaciona con los tipos estructurales. Cuando son precipitados con soluciones acuosas de etanol al 45- 50% de concentración pueden parecer gomas poco o muy pegajosas o como polvo fino o flocculento.

Cuando se deshidrata el Dextrano puede presentarse como fibras voluminosas, polvos densos o esponjosos. Los Dextranos absorben humedad del medio ambiente con facilidad.

1.3.1.1).- Peso Molecular.

El Peso Molecular promedio determinado por la técnica de luz dispersa para el Dextrano preparado con cepa B 512 tiene un valor en el rango de 40 a 50 $\times 10^6$, y para Dextrano sintetizado enzimáticamente de cepa B-512 son de 35 a 125 $\times 10^6$. Las soluciones de estos Dextranos como las de otras cepas son polidispersos, con una amplia distribución en Peso Molecular. Dichas materiales solo pueden ser descritos en términos de Pesos Moleculares promedio, para lo cual se utilizan los términos "Número Promedio" M_n y "Peso Promedio" M_w ; por lo tanto su composición molecular se define por la curva de distribución de los diversos Pesos Moleculares. (Fig.1.6)

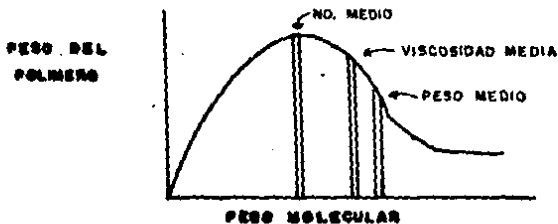


Fig. 1.6 Distribución de los Pesos Moleculares de un polímero típico.

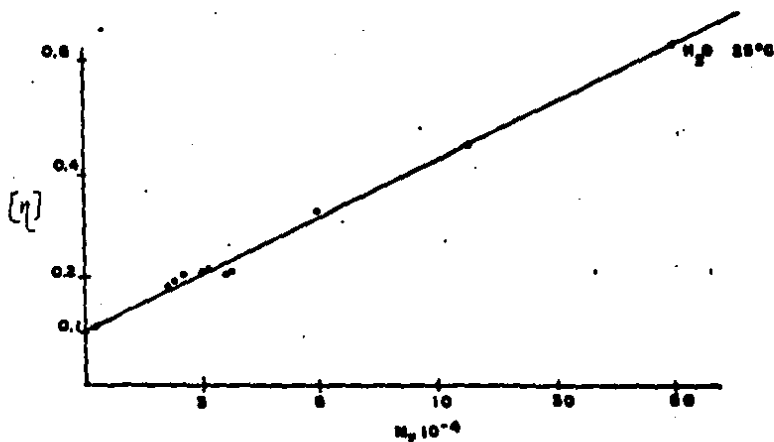


Fig. 1.7 Gráfica de viscosidad. Donde la viscosidad intrínseca y el Peso Molecular (promedio de viscosidad) M_v , están dados en escalas logarítmicas. La relación resultante es aproximadamente lineal, correspondiendo a la relación empírica $[\eta] = 10^{-5} M_v^{1/2}$.

Esta curva está dada por las fórmulas:

$$M_n = \frac{\sum n_i \times M_i}{\sum n_i}$$

$$M_w = \frac{\sum n_i \times M_i^2}{\sum n_i}$$

donde n_i = número de moléculas con Peso Molecular = M_i .

y la distribución de Pesos Moleculares está dada por: M_w / M_n

Generalmente M_w tiene un valor entre M_n y $3M_n$ y entre más cerca esté el valor de M_w al M_n la distribución de Pesos Moleculares es menor.

La viscosidad intrínseca del Dextrano es la propiedad más simple relacionada con el Peso Molecular y puede ser medida en el laboratorio. Está dada por la ecuación:

$$[\eta] = KM^n$$

donde K y n son parámetros que tienen valores diferentes para Dextranos con radio de ramificación diferente. Así por ejemplo Ingelman y Halling reportaron para Pesos Moleculares en el rango de 40,000 a 300,000:

$$[\eta] = 8.2 \times 10^{-7}M + 0.18$$

mientras que Wales reportó para Dextranos de Pesos Moleculares entre 20,000 y 250,000: (2)

$$[\eta] = 10^{-3} M^{1/2}$$

basado en esta última se determinó una gráfica de experimentos realizados por Wales con Dextrano de cepa B 512. (2) (Fig 1.7)

1.3.1.2).- Solubilidad

En general, los más solubles son los Dextranos con mayor contenido de enlaces 1-6. Existiendo otros Dextranos que muestran una dificultad inex-

pliable de disolverse desde el estado amorfo seco o húmedo.

Se han clasificado en cuatro tipos existentes:

a) soluble fácilmente a temperaturas ordinarias en agua, formamida, dimetilformamida, etilenediamina o sosa diluída.

b) soluble en agua con técnica especial de hidratación a temperaturas de entre 4° y 25° C.

c) soluble en agua primero con la técnica b y posteriormente auto clave (120° C, 15psi).

d) repitiendo b y c y despues se alcaliniza la suspensión.

El Dextrano de la cepa B 512 se disuelve fácilmente en agua pero - los compuestos como urea 6N, glucosa al 50% y glicina 2M son solventes muy superiores al agua.

1.3.1.3).- Rotación Óptica.

La rotación óptica específica $[\alpha]_D^{25}$ tiene valores de + 199°, + 203° y + 215° en agua, hidróxido de potasio 1N y formamida respectivamente.

Los valores de $[\alpha]_D^{25}$ para muchos Dextranos solubles en formamida - están en el rango de + 208 a + 233° y para los Dextranos medidos con - hidróxido de potasio los valores fueron entre + 203 y + 232°.

Hay una correspondencia directa entre la magnitud de rotación y - la proporción del número de enlaces 1-3 del Dextrano. Pero para Dex- tranos con más del 75% de enlaces 1-6, la rotación no varía significa- tivamente con el diferente contenido de enlaces 1-3, 1-2 ó 1-4.

Se han medido un número de Dextranos en agua y en soluciones de - cobre y amonio a 4358 Å. La rotación molecular cambió en la solución de cobre y amonio, con rango de -92,500 a +65,400, que permite la dife- renciación entre enlaces 1-2 y 1-4 en los Dextranos.

1.3.1.4).- Rayos X.

Bajo condiciones apropiadas de deshidratación lenta o humidifica- ción (a 85% rh, 25°C), los Dextranos de 8512 y otras cepas que con- tienen una alta proporción de enlaces 1-6, muestran buenos patrones de Rayos X. Con pocas excepciones los Dextranos que tienen una alta pro- porción de enlaces que no sean 1-6, permanecen amorfos.

1.3.1.5).- Viscosidad.

La viscosidad intrínseca en decilitro por gramo están en el rango de 0.15 a 2 (en agua a 25°C) y de 1.5 a 3.1 (en 0.1N IN a 25°C) pa-

ra Dextranos solubles en agua, el radio de $[\eta]$ IN KON / $[\eta]$ H₂O está entre 1.2 y 1.4.

1.3.1.6).- Forma molecular, flexibilidad y ramificación.

Las moléculas de Dextrano de B 512 en solución se piensa que tienen una forma aproximadamente esférica o pueden ser helicoidales. La flexibilidad está dada por la birrefringencia de flujo y otras propiedades de flujo. La libertad de rotación debe ser favorecida por enlaces glucopiranosídicos en las posiciones de Carbono 6.

En Dextrano B 512 la ramificación ocurre a través de aproximadamente 5% de enlaces 1-3; por lo menos el 80% de las ramificaciones internas parecen ser de una unidad de glucosa de largo, y muy pocas ramificaciones parecen ser muy largas. Aunque el número de estas ramificaciones largas probablemente nunca exceden el 1% del número total de unidades de glucosa, son de gran importancia en la determinación de las propiedades de los Dextranos; y estas propiedades difícilmente se afectan del todo por las ramificaciones cortas que están presentes en mayor número.

1.3.1.7).- Otras constantes.

Incremento refractivo $dn/dc = 0.154$ ml/g a 436 mililamdas en el orden de 2000 Å.

La constante de sedimentación $S_{20,0.1N,ICl} = 14$; el volumen parcial específico = 0.606 ml/g y densidad del 48.3% en solución (w/w) = 1.230, ambos en agua a 25°C. La constante de difusión rotatoria en estado interaccionado $[\eta_0/r]_{c=0} = 0.01$.

1.3.2).- Propiedades Químicas.

Una proporción alta de enlaces 1-6 en un Dextrano permiten una estabilidad a la degradación bajo condiciones ácidas o alcalinas.

Para la hidrólisis ácida, la energía de activación para Dextrano preparado con B 512 se ha calculado en 30 a 34 kcal/mol.

Bajo condiciones ácidas los enlaces 1-6 de los Dextranos son más lábiles que los enlaces 2, 3 y 4.

Los grupos hidroxilo en los Dextranos son los sitios donde ocurren más derivaciones. El hidroxilo del C 2 parece ser el primero en reaccionar. La ausencia de hidroxilos en el C6 se espera disminuya la solvatación de los derivados. La mayoría de los derivados de Dextranos están en

proceso de patentes.

Entre los ésteres se incluyen aquellos con ácidos alifáticos simples, ácidos grasos de cadena larga, ácidos dibásicos, aminoácidos y los ácidos nítrico, sulfúrico y fosfórico. En los éteres incluimos alquilo simples, con carboximetilo y cianoetilo, el arilo y aquellos hechos con aldehidos bifuncionales y agentes epóxidos. Se conocen carbamatos y xantatos. En soluciones alcalinas, los complejos de Dextrano que se forman tienen una composición definida pero estructura incierta con muchos iones metálicos tales como aquellos de antimonio, calcio, cobalto, cobre y uranio.

1.3.3).- Propiedades Bioquímicas.

El comportamiento de los Dextranos en reacciones enzimáticas, inmunológicas e inmuoquímicas dependen de las diferencias estructurales de acuerdo a la cepa utilizada. El Dextrano de la cepa B,512 es digerible y ha sido utilizado para el crecimiento de ratones. Existen dextranasas en la mucosa intestinal y otros tejidos en mamíferos como hígado, riñón, bazo, etc. pero no en la sangre.

El Dextrano clínico administrado intravenosamente es metabolizado lenta y completamente en el cuerpo, pero no es atacado por la alpha amilasa de la sangre. Las dextranasas de las bacterias del intestino humano y otras bacterias atacan los enlaces 1-6.

1.4).- Actividad Fisiológica del Dextrano clínico.

1.4.1).- Definición.

Los Dextranos nativos son aquellos que se producen normalmente por fermentación o síntesis enzimática y que no han sido alterados por hidrólisis y fraccionamiento. El Peso Molecular promedio del Dextrano de la cepa NRRL B 512 F es de 30 a 50 millones, y al fraccionarse o hidrolizarse nos conducen a los Dextranos clínicos que tienen Pesos Moleculares bajos como el utilizado para expansor del volumen sanguíneo $PM = 75,000 \pm 25,000$. (16)

1.4.2).- Efectos principales.

1.4.2.1).- Substituyente de Plasma sanguíneo.

El Dextrano fue introducido como expansor del volumen plasmático ha

ce más de 30 años. (17)

Cuando una persona pierde parte de su volumen sanguíneo está expuesta a muchos trastornos metabólicos. Los sujetos que han pasado por diferentes traumas o shocks, en accidentes, incendios, operaciones quirúrgicas, guerras, etc.; deben recuperar su volumen plasmático lo más rápidamente posible.

Cuando el plasma ó sangre completa no están a disposición del paciente los substituyentes del plasma sanguíneo son una alternativa segura y económica.

Un buen substituyente de Plasma sanguíneo idealmente debe producir un efecto predictivo y reproducible en el volumen, de suficiente duración que permita llevar a cabo cirugía adecuada y terapia hemodinámica.

Debe ser completamente excretado o metabolizado. La capacidad de un coloide para actuar como expansor del volumen plasmático puede ser expresado por su eficiencia oncótica definida como el volumen de agua retenido en la vascularidad por cada gramo de coloide a una presión capilar normal. Este volumen es alrededor de 18 ml por gr. para la albúmina y de 30 a 35 ml. por gr. para el Dextrano. La concentración coloidal isotónica del Dextrano circulante es de 4 a 5 %, por lo que los 4 ó 5 grs. de Dextrano fijarán 100 ml. de agua en condiciones circulatorias normales. (15)

La distribución del Peso Molecular influye en la extensión y duración del expansor. Los Dextranos clínicos obtenidos en Suecia por Pharmacia, Dextrano 40 (Rheomacrodex) y Dextrano 70 (Macrodex), tienen una distribución de Peso Molecular de 1.6 y 1.8 respectivamente, lo que quiere decir que más del 90% de las moléculas están comprendidas en los Pesos Moleculares extremos de 15,000 a 75,000 para Rheomacrodex y de 20,000 a 115,000 para Macrodex.

Se han comparado infusiones salinas de sangre autóloga, Plasma, Dextrano 70, Dextrano 40 (18) y se comprobó que la expansión del volumen plasmático medido después de 1.5 y de 4 horas respectivamente era igual o mejor que la sangre completa o el plasma.

Los coloides deben durar por lo menos 6 a 8 hrs. con la capacidad de substituyente de Plasma sanguíneo para considerarlo un buen expansor y el Macrodex cumple este requisito.

El Dextrano es eliminado principalmente por los riñones, las moléculas con Pesos Moleculares menores de 15,000 pasan libremente por los filtros glomerulares. Moléculas mayores están más restringidas en su paso, y el Dextrano con Peso Molecular mayor a 50,000 no es excretado prácticamente.

En un estudio de Excreción renal del Dextrano encontramos que el 60 ó 70% de la infusión (500ml. al 10%) de Dextrano 40 (Rheomacrodex) se ha eliminado después de 12 horas, mientras que el Dextrano 70 (Macrodex al 6% Sin.) fué del 30 al 40 %. Es de especial interés ver que las infusiones de Microdex y Rheomacrodex después de 4 ó 6 horas corresponden aproximadamente al volumen infundido. (Fig.1.8) (17)

El Dextrano de Peso Molecular mayor a 50,000 se elimina completamente de la sangre por biodegradación, pero proporciona el suficiente tiempo para que las proteínas del plasma normales tomen el lugar del sustituyente. (2)

Ademas se requiere que el coloide para ser buen expansor tenga estabilidad en el almacenamiento sin ser refrigerado, debe ser cristalino para detectar facilmente contaminación y debe ser fluido a temperaturas de 0°C.

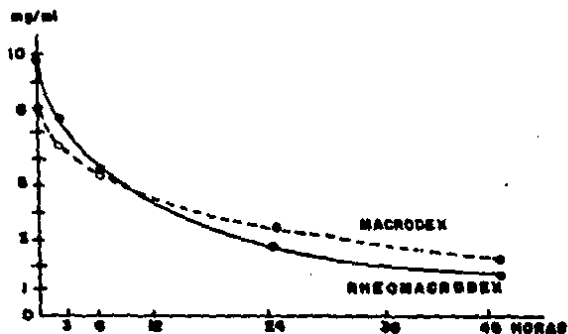


Fig. 1.8 Concentración de Dextranos en suero seguido de infusión de 500 ml. de Dextrano 70 (6%) y 500 ml de Dextrano 40 (10%).

La sustancia no debe ser antigénica, no debe producir cambios histológicos, no permaneciendo en tejidos por períodos largos. No debe actuar como diurético, o causar aumento en el rango de sedimentación eritrocítica.

1.4.2.2).- Promoción del flujo periférico.

En el shock o trauma comunmente hay aumento de la resistencia periférica, debida a la agregación de celulas rojas, especialmente en el segmento postcapilar debido a la disminucíón de la velocidad de flujo. El shock hemorrágico es seguido de varias acciones del sistema cardiovascular:

- a) hipovolemia e hipotensión
- b) vasoconstricción compensatoria
- c) agregación intravascular

La vasoconstricción afecta la distribución del Oxígeno y se da una acidosis metabólica que a su vez reduce el gasto cardiaco y por lo tanto empeora la microcirculación.

La terapia del shock debe basarse en mejorar la difucion en tejido y el tratar de revertir las acciones del sistema cardiovascular antes mencionadas. (19)

Todos los coloides afectan la estabilidad de suspension de la sangre. La extension de esta influencia depende del tipo de coloid y su distribución de Peso Molecular. Las proteínas de alto Peso Molecular en el plasma (ej. fibrinógeno) causan agregación de eritrocitos; ocurre lo mismo con los Dextranos de Peso Molecular alto, pero con el Dextrano 70 solo se alcanza la misma agregación que con el Plasma patológico.

El Dextrano de Peso Molecular 40,000 no permite la agregación por lo que es empleado para restablecer el flujo sanguíneo microcirculatorio.

Esta desagregación es el resultado de varios factores como la expansion del volúmen plasmático, disminucíón en viscosidad y el subsecuente mejoramiento del flujo sanguíneo.

Por lo general primero se usa Dextrano 70 en trauma y shock cuando el propósito principal es el restablecimiento del volumen sanguíneo. El deficit es rápidamente restablecido hasta 1000o 1500 ml. de Dextrano 70 - son administrados inicialmente, seguidos de sangre completa o paquete celular para alcanzar y mantener un grado moderado de hemodilución. En paralelo, los requerimientos de agua, electrolitos y glucosa dentro de las primeras 24 hrs. son calculados, y se inician las infusiones.

Si despues de la restauración adecuada del volúmen plasmático, el flujo sanguíneo periférico todavía no es el adecuado debido a la agregación eritrocítica o vasoconstricción, se utilizan los efectos del Dextrano 40 en combinación con vasodilatación farmacológica.

1.4.2.3).- Efecto Antitrombótico.

Las propiedades antitrombóticas del Dextrano en pacientes de cirugía fue descubierto por Koekenberg. (17)

Este efecto se ha comprobado en muchos estudios realizados desde 1962 y que demuestran que el Dextrano previene la trombosis venosa y la embolia pulmonar.

La trombosis venosa se da por lo general despues de cirugía y se ha comprobado experimentalmente que los pacientes tratados con Dextrano tienen menos probabilidades de sufrir la formación de trombos.

En la embolia pulmonar se han reportado una disminución en la incidencia de un 24% hasta 34%.

Los tratamientos para la prevención de la embolia pulmonar incluyen la administración de heparina y Dextranos, teniendo cada uno sus ventajas (17):

A) Ventajas de Dextranos.

a) Se reduce la necesidad de transfusiones sanguíneas al expandir el volúmen plasmático.

b) Las complicaciones de sangrado son pocas o nulas.

c) Efectivo aun cuando solo se administre el día de la cirugía.

B) Desventajas de Dextranos.

a) Posibles reacciones anafilácticas

2) Volúmen restringido para pacientes de edad avanzada y con insuficiencia cardiaca.

Se han desarrollado drogas similares a la heparina como es el sulfato de Dextrano (solo utilizado en Inglaterra) pero el tratamiento prolongado puede producir alopecia. (20)

Tambien se están experimentando derivados de Dextranos como aquellos que contengan grupos ácidos carboxílicos o bencilsulfatos que pueden ser muy prometedores. (21)

El mecanismo de acción del Dextrano en la profilaxis de los casos de Trombosis venosa y Embolia pulmonar se basa en:

A) Expansión del volumen plasmático que mejora el flujo de sangre a través de las venas, donde la mayoría de los trombos pre y postoperatorios están formados.

B) Efecto en el factor VIII, dando como resultado el aumento de lisis de los trombos formados con una disminución paralela de adhesión plaquetaria (17) (22), como efecto hemostático en el factor 3 plaquetario al ser disminuido. (23)

La red de fibrina formada en la presencia del Dextrano es más susceptible al sistema fibrinolítico. El efecto del Dextrano sobre el factor VIII alcanza su máxima a las 3 - 5 hrs. de la infusión y pueden ser reversibles con la aplicación del factor VIII concentrado.

El mecanismo es aún desconocido pero se cree por algunos estudios que el Dextrano puede interferir en la síntesis y /o los mecanismos de liberación del factor VIII o von Willebrand. (24)

En el síndrome de trombocitopenia asociado a la heparina se produce agregación plaquetaria la cual puede ser disminuida con Dextrano 40. (25)

El Dextrano no debe ser administrado a pacientes con desórdenes de sangrado o a pacientes ya heparinizados.

1.5).- Efectos metabólicos.

1.5.1).- Efectos en circulación, excreción, almacenamiento y metabolismo.

En la práctica, los substituyentes de Plasma sanguíneo sufren varias cantidades de pérdida, por medio de excreción o metabolismo, por pasar al fluido extravascular y por almacenamiento. En el caso del Dextrano, la velocidad del metabolizado no es rápida, para que las pérdidas importantes durante el periodo crucial de las primeras 24 - 48 hrs. del tratamiento del shock sean aquellas resultantes de la difusión a través de los tejidos y excreción vía riñones. Ambas pérdidas relacionadas con moléculas pequeñas.

Los efectos en detalle en dinámica circulatoria de una infusión de Dextrano han sido demostrados por cateterización de pacientes que pisen por operaciones quirúrgicas. La presión del aurículo derecho aumenta cuando el Dextrano es inyectado por lo que el gasto cardiaco y la presión sanguínea aumentan correspondientemente.

Estudios detallados de la excreción de las moléculas de Dextrano de diferentes tamaños se han realizado por Ricketts desde 1950 y por Brewer en 1951. Concluyendo que la mayoría del Dextrano es excretado por los riñones por filtración glomerular, mientras que cualquier excreción tubular o reabsorción son de muy pocas cantidades, cuando el Dextrano eliminado fuera de bajo Peso Molecular.

Sus resultados sugieren un rango de permeabilidad glomerular en lugar de un nivel exacto de filtración o retención, propusieron vida media para fracciones cercanas a 25,000 de 1.2 horas, mientras que para fracciones de 38,000 en Peso Molecular fue calculado como 4.8 hrs.

Para moléculas con Pesos Moleculares promedio de 50,000 o arriba no fueron significativos sus datos de excreción. Las moléculas de Dextrano de mayor Peso Molecular encontradas en orina después de la infusión del producto en adultos normales fueron aquellas cercanas a 46,000 pero tres pacientes con quemaduras excretaron material con Pesos Moleculares tan altos como 56,000. En otros casos de permeabilidad glomerular aumentada como nefritis, la permeabilidad al Dextrano puede aumentarse más allá y moléculas de 104,500 en Peso Molecular pueden aparecer en orina bajo estas condiciones.

Mientras que el material de tamaño pequeño es perdido rápidamente, el Dextrano de alto Peso Molecular puede encontrarse en orina cuando se han realizado transfusiones en gran escala. Tal orina es notoriamente más viscosa, pudiendo contener 10 grs. o más de Dextrano por cada 100 mls. de orina, sin haberse demostrado que cause daños físicos.

Los experimentos con Dextrano en circulación han mostrado que el efecto principal de la infusión es el de mantener sin alteraciones en cantidades de proteínas plasmáticas circulantes en dilución. Esto puede ser falso si se dan grandes cantidades de Dextranos cuando el volumen sanguíneo ya es normal. En este caso el Plasma que contenga al Dextrano y a las proteínas se pierde probablemente del torrente circulatorio hasta que el volumen sea corregido.

En general los Dextranos como muchas otras sustancias con macromoléculas, se encuentran temporalmente almacenados en varios órganos. En el ratón se ha detectado y estimado químicamente en el hígado, bazo, riñones y glándulas linfáticas después de dos a tres semanas de haberse inyectado.

Maycock detectó cantidades pequeñísimas en ciertos tejidos hasta 12 meses después de la inyección. Friberg examinó el almacenamiento después de la infusión de diferentes tamaños de fracciones moleculares y encontró que la cantidad en el riñón era mayor con las fracciones de Dextrano de tamaño pequeño, pero estos trabajos no pudieron aclarar si la presencia del Dextrano significaba reabsorción, excreción o almacenamiento. Después de inyecciones por 100 días seguidos a conejos, se detectaron solo pequeñas cantidades del Dextrano en hígado, bazo y sistema retículo endotelial.

Cuando se realizaron experimentos humanos en funcionamiento renal no se encontraron diferencias en filtración glomerular o en reabsorción tubular por el efecto del compuesto. Similarmente en la función hepática medida por ácido hipourico, fosfatasa, bilirrubina y urobilinógeno se encontraron sin alteración alguna. Todo esto nos lleva a pensar que una muy pequeña proporción del Dextrano clínico infundido permanece por un período corto de tiempo en algunos órganos, particularmente aquellos relacionados con el sistema retículo endotelial, pero el material ahí retenido va desapareciendo gradualmente, aparentemente sin causar ningún daño.

Por algunos autores se ha considerado la posibilidad del metabolismo que ocurre en el tracto intestinal; Aberg observó que algunas bacterias normales en el cuerpo humano son capaces de hidrolizar el Dextrano mientras que otros autores han demostrado la presencia del Dextrano en el jugo gástrico después de haberse inyectado en animales y hombre, pero el significado de la ruta para la excreción del compuesto todavía no se determina. Bloom y Wilhelmi reportaron la aparición de una enzima en el duodeno de las ratas capaz de hidrolizar Dextrano, si esto es posible en otras especies cualquier Dextrano que llegue al intestino se hidrolizará rápidamente por lo que no aparecerá en suficiente cantidad detectable. (26)

1.5.2).- Reacciones Anafilácticas.

Aún cuando los Dextranos nativos de altos Pesos Moleculares pueden inducir la formación de anticuerpos, una o repetidas inyecciones de Dextranos clínicos no han mostrado ser antigénicos. Las posibles

reacciones al Dextrano usualmente aparecen durante la infusión de los primeros 20 a 30 mls. La incidencia de reacciones anafilácticas es muy baja. En un reporte en 1974 de Macrodex o Dextrano 70 la incidencia global de reacciones anafilácticas fué de 0.0061 y para Rheomacrodex o Dextrano 40 fue de 0.0011. (18)

1.5.2.1.)- Antigenicidad.

Desde que el Dextrano fue introducido en el mercado como sustituto de Plasma sanguíneo se le ha atribuido provocar antigenicidad, la prueba que se utilizó y aún se utiliza para revocar esta idea es la inyección de cantidades relativamente grandes de Dextranos en conejos, dadas intravenosamente y que no provocan la formación de anticuerpos. (2).

Por otra parte se ha encontrado que el Dextrano puede precipitarse y fijar complemento en la presencia de ciertos anticuerpos y por lo tanto se le ha considerado como hapteno. Las reacciones anafilácticas en contra del Dextrano pueden manifestarse por la aplicación de cantidades pequeñas o fracciones de Dextranos parcialmente hidrolizados inyectados en el hombre y animales, como la formación de anticuerpos predominantemente con especificidad α -(1-6) o los Dextranos que tengan fuertes cantidades de enlaces 1-2, 1-3 y 1-4 que provocan la formación de anticuerpos específicos contra estos enlaces; aún que en 1973 Torii, dijo que los anticuerpos con especificidad auténtica por enlaces 1-4 no se ha demostrado hasta ahora. (13).

Las reacciones anafilácticas pueden dar reacciones en piel hasta el shock sanguíneo de acuerdo a su severidad, y estas reacciones parecen tener relación con el Peso Molecular del compuesto directamente.

Las reacciones se dividen en 4 tipos:

Tipo 1 Manifestaciones cutáneas (Orticaria, sarpullido)

Tipo 2 Hipotensión media, taquicardia, náusea, disnea.

Tipo 3 Shock, broncoespasmo posiblemente mortal.

Tipo 4 paro cardíaco o respiratorio.

No existe evidencia de haber relación entre el sexo y la incidencia de estas reacciones, ocurriendo en todos los rangos de edades teniendo mayor frecuencia y severidad con personas de edad avanzada. Se pueden observar estas reacciones en pacientes bajo los efectos de anestesia y sin ellos. En un 50% de los pacientes con reacción tipo 1 se encontró historial de alergias, mientras que en los pacientes con tipo 2 al 4 la dispo-

sición a alergias fue igual que en la población normal. (27)

A los pacientes que han experimentado shock anafiláctico, con frecuencia se les demuestra anticuerpos tipo IgE y se les ha considerado - los responsables del desarrollo de los síntomas clínicos. Por lo tanto, se examinaron muestras de suero de pacientes que reaccionaron contra -- del Dextrano para la localización de anticuerpos IgE. No se pudo demos- trar anticuerpos formados antes o después de las reacciones anafilácti- cas en monos, por anafilaxis cutánea pasiva, por técnica radio-alergo- sorbente y células rojas modificadas unidas a antiglobulina como anti-ge- no. Por lo tanto podemos deducir que la anafilaxis citotrópica mediada por IgE no se da en este caso.

También se analizaron sueros de pacientes que reaccionaron contra el Dextrano con suma total de todas las clases de Ig: IgG, IgA, IgM, Ig E e IgD por la prueba de hemaglutinación pasiva usando células rojas - sensibilizadas con Dextrano-stearoil. Todos los pacientes con grado 3 y 4 si mostraron tener títulos altos de anticuerpos indicando así el - juego patogénico de tales anticuerpos. Su presencia puede significar inmunización por Dextrano en si o por polisacáridos que den reacciones cruzadas con el.

1.5.2.2).- Patomecanismo.

Las reacciones anafilácticas inducidas por el Dextrano se ha anali- zado para ver su posible patomecanismo, del cual se concluye (28) se di- vide según la Fig. 1.9

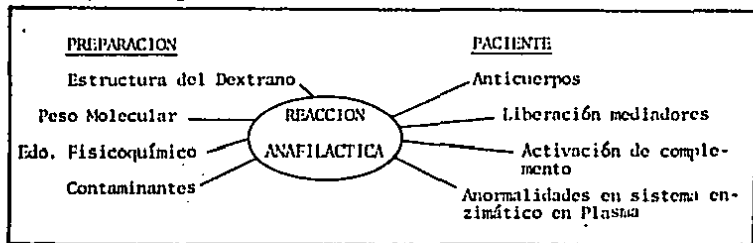


Fig. 1.9 Mecanismos potenciales del desarrollo de reacciones anafi- lácticas en contra del Dextrano.

Molécula del Dextrano. Las reacciones alérgicas han disminuido en la actualidad con el uso del Dextrano clínico de B 512 casi lineal, ya que como se mencionó antes las ramificaciones de enlaces alpha-1-3 con tres o más unidades de glucosa son determinantes antigénicos.

Contaminantes. Los contaminantes pueden jugar un papel casual en el desarrollo de reacciones pero el Dextrano clínico en solución no contiene macromoléculas contaminantes que pueda llevar a la formación de anticuerpos en conejos, en anafilaxis cutánea heteróloga pasiva.

Anticuerpos reactivos al Dextrano. En resumen no hay evidencia de la formación de anticuerpos in vivo o in vitro en las reacciones anafilácticas inducidas por Dextrano. Aunque se han determinado títulos de anticuerpos contra Dextrano formados posiblemente por inmunización previa ya que muchos individuos pueden ser estimulados en diferentes maneras como el estar en contacto con contaminantes de sacarosa, ácidos alimenticios o caries dental, etc. Así como los polisacáridos que reaccionan cruzadamente con el Dextrano que pueden provenir de microorganismos tales como Klebsiella, Salmonella, pneumococcus y Streptococcus. (28)

Existen ensayos de Herbe y Neil (2) de precipitaciones con antisero de Salmonella typhi. Mas tarde Zozaya, Neil y Abrahams vieron reacciones de precipitación y fijación de complemento con S. oranienburg, S. paratyphi, S. cholerae suis, etc. Los antiseros de pneumococcus del tipo II, XII, y XX suelen ser los más comunes en presentar reacción.

1.5.2.3).- Cambios histológicos.

Los riñones e hígados que han sido sometidos a observación en experimentos animales con Dextrano, no han mostrado cambios histológicos cuando se dieron soluciones de Dextrano clínico a perros, conejos y ratones normales en volúmenes equivalentes a 20.0 grs. de Dextrano por kilogramo de peso; y en cuanto a la opinión general los Dextranos administrados en cantidades moderadas no son irritantes en tejido, aunque se han observado que infusiones de Dextrano 40 puede dar como resultado cambios histológicos transitorios de los lisosomas y de las células tubulares del riñón, y no asociado con toxicidad o función renal desapareja.

1.6).- Usos y aplicaciones.

Los Dextranos tienen muchas aplicaciones y usos dependiendo de su **Peso Molecular**. Aquellos solubles en agua y de tipo lineal de algunas cepas son efectivos para algunos usos potenciales, como para la recuperación del petróleo. Mejora la calidad de los aditivos para taladreo en barro mientras que el tipo lineal muestra una resistencia relativamente alta al deterioro en terrenos y pueden ser recubrimientos de protección muy efectivos para las semillas y defloculantes en la producción de papel fino. Algunos Dextranos formadores de capas finas se utilizan para parchar algunas áreas para la deposición de metal en procesos de implantación de gas y al ser solubles en agua pueden removerse con facilidad. (1)

De acuerdo a Hepner y Male (1982) (4) la producción de Dextrano en 1980 se estimó en 100 toneladas en Europa Oriental y 200 toneladas a nivel mundial. Donde la mayoría de los polisacáridos son convertidos por procesos hidrolíticos (hidrólisis ácida suave) a la forma de Dextrano que se utiliza para fines farmacéuticos, de investigación, industriales, etc.

1.6.1).- Usos Industriales.

En cromatografía, la preparación de Dextrano granular que se comporta como membrana dializante. Se utiliza en columnas de separación de moléculas por su tamaño, donde después de poner el solvente las moléculas grandes quedan en la parte superior de la columna y las moléculas pequeñas por debajo de las anteriores; al proceso se le conoce como filtración con cromatografía en gel. (29)

En la producción de gels para uso bioquímico se utiliza Dextrano de alto **Peso Molecular**, empleado para sintetizar productos con alta recuperación de agua. Existen gels con epíclorohidrina y los de tipo "enlace cruzado" o Sephadex que tienen como propósito servir de adsorbentes con diferentes porosidades y rango de fracciones.

Si se añaden otros grupos químicos a las moléculas nos lleva a obtener adsorbentes con propiedades lipofílicas. Sephadex es el nombre comercial del producto fabricado por Pharmacia (Suecia) que se le dió a este compuesto que tienen amplia aplicación en la separación y purificación de moléculas biológicas basado en su carga, tamaño molecular, etc. (4)

Dextranos de **Peso Molecular** 18,000 , 74,000 , 228,000 , 7,400,000 en soluciones acuosas se utilizan como medio superior para la suspensión y polimerización de monómeros industriales.

Para el recubrimiento de placas haciéndolas fotoresistentes con solución acuosa de Dextrano (PM 10,000 - 300,000) al 12% y sal de cromo - 0.5 - 3.0% para procesos de grabado en agua. Si el recubrimiento es en filmes radiológicos o litográficos se aumenta el poder de cubrimiento, máxima densidad, contraste y velocidad con emulsiones de gelatina-hialuro de plata; para lo cual se utiliza Dextrano con Peso Molecular mayor o igual a 10,000 en proporción de 5 - 50% en peso del total de sólidos en ese tipo de emulsiones. Dentro de la industria alimenticia estabiliza mieles, jarabes y similares contra la cristalización, actuando también como adhesivos, humectantes y alta tolerancia al pH. Puede estabilizar la textura de helados y refrescos de frutas. (1)

1.6.2).- Usos en investigación.

Separación de partículas y macromoléculas en sistemas de dos fases utilizando sodio-Dextrano, sulfato-Dextrano, carboximetilDextrano sólido o dietilaminoetilDextrano. Separación de moléculas o fraccionamiento de sustancias en soluciones acuosas con límites de exclusión en el rango de PM de 5,000 a 200,000 utilizando Dextranos de PM 30,000 a 2×10^6 .

Fraccionamiento de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y medio de intercambio de iones utilizando Dextranos en gels de PM 30,000 a 2×10^6 . (1) El Dextrano puede funcionar como transportador para aumentar la vida de circulación de enzimas administradas al cuerpo humano o animal. Se han preparado glicoconjugados formados de Dextranos solubles y enzimas tales como la carboxipeptidasa G y arginasa. (4)

El Dextrano de PM 80,000 soluble unido covalentemente a la adenosindeaminasa es utilizado para prolongar la vida del Plasma. (30)

Otro estudio con Dextrano Tc99m como agente marcado se utiliza en investigaciones en angiocardiógrafa (31) o en drenaje linfático de mieloma maligno (32). El Dextrano recubriendo carbón marcado para estudios de receptores de estrógeno en tejido de cáncer de pecho (32) es otra aplicación.

1.6.3).- Usos Clínicos.

Los Dextranos tienen un amplio rango de efectos en diferentes sistemas temas fisiológicos y debido a su acción se clasifican principalmente

como:

1) Sustituyente de Plasma sanguíneo, que posee las mismas propiedades osmóticas equivalentes a las proteínas plasmáticas. En soluciones - al 6% de concentración en solución de Cloruro de sodio al 0.9%, por infusión intravenosa, con Peso Molecular 75,000 ± 25,000. Con Dextrano 60 en reemplazo quirúrgico (34) o en volumen sanguíneo pre y postoperatorio. (35)

2) Tratamiento de hipoproteïnemia, edema nefrótico o cerebral y hemodilución en eritrocitosis secundaria (36) con soluciones glucosadas al 10-12% de Dextrano en infusión intravenosa.

3) Reducción de agregación eritrocítica con soluciones del 10% en cloruro de sodio al 0.9%, infusiones intravenosas de Dextranos de Peso Molecular 40,000 ± 20,000.

4) Agente para tratamiento de anemias por deficiencia de hierro, especialmente en la infancia y el embarazo de pacientes que no respondan al tratamiento oral o que requieren de una compensación rápida del metal proporcionado en solución de hierro dextrano en cloruro de sodio al 0.9% con 50 mg/ml de hierro elemental, inyectada por vía intramuscular utilizando Dextrano de Peso Molecular 2,000 a 10,000.

5) Anticoagulante y agente antilipémico con Dextranos de Peso Molecular de 7,000 a 10,000.

6) Resuscitación en pequeño volumen con solución salina de Dextrano 70 hipertónico, para el restablecimiento de la función cardiovascular, metabólica y neurohumoral en la resuscitación después de una hemorragia grave por accidentes.

Se han realizado muchos estudios muy interesantes que destacan la importancia del Dextrano y su utilización; algunos se mencionan a continuación:

Anestesia. Prolonga el efecto anestésico (37) (38).

Cirugía. Los Dextranos 70 en cirugías de corazón abierto son sustitutos del Plasma ayudando a que el volumen total no se descompense -- (37), en cirugía reconstructiva de carótide el Dextrano 40 actúa como -- droga antiplaquetaria y reduce la incidencia de complicaciones neurológicas que son comunes en este tipo de operaciones (4); en cirugía reconstructiva arterial reduce la producción de trombos (41).

Preservación de corneas en ratones con Dextrano 40 y humanas con --

Dextrano T 500. (42) (43)

Tratamiento en pérdida del oído con Dextrano 70 y vincamina. (44)

Tratamiento de gangrena con hemodiluciones de Dextrano 40 que aumenta la presión de Oxígeno en el tejido de pacientes con arterias ocluidas (45), hemodiluciones con Dextrano 70 para cesárias (46), en tratamiento de arteriopatía en extremidades inferiores (47) (48) y en otras cirugías la hemodilución mantiene niveles de hematocrito aceptables (49).

Insuficiencia microcirculatoria causada por traumas que aumentan la viscosidad de la sangre y que con Dextrano 40 es corregida (50).

Insuficiencia respiratoria en el adulto es disminuida su incidencia por que el Dextrano 70 disminuye el periodo de shock séptico (51) o traumático-hemorrágico (52).

La prevención del tromboembolismo por el Dextrano 40 en período postoperatorio (53) con Dextrano 70 en embolismo pulmonar postoperatorio (54). Como profilaxis en embolia pulmonar fatal con Dextrano 70 (55) (56).

Tratamiento de Macroglobulinemia primaria (57). Tratamiento de obstrucciones intestinales (58), de Osteitis alveolar (59), de erosión corneal y edema corneal (60), tratamiento con hemodilución de Dextrano 40 (61) y de Dextrano 60 (62) en alteraciones de microcirculación de pancreatitis.

En shock hemorrágico por exposición a aire hiperbárico con Dextrano 70 (63). Tratamiento con Dextrano 70 en shock e hipovolemia (64). Resuscitación de hipovolemia hemorrágica con Dextrano 70 (65), tratamiento hipovolémico de arteriopatías crónicas en extremidades con Dextrano 70 (66).

El Dextrano 40 puede actuar como modulador inerte y actividades de coagulación en pacientes con traumas (67).

Respuestas cardiorespiratorias al Dextrano 40 por los cambios de transporte de Oxígeno y hemodinámicos por hemodilución y expansión del Plasma (68). En transfusiones sanguíneas homólogas para disminuir las posibles secuelas de SIDA (69).

Tratamiento de isquemia de vasoespasmocerebral con Dextrano 40 (70), prevención de trombosis en extremidades inferiores (71), tromboembolias (72), tromboembolias en embarazo (73). Prevención de adhesiones intraperitoneales causadas por el lubricante de guantes quirúrgicos (74).

El Dextrano 70 como previsor de adhesión en coagulación sanguínea de cirugía en mujeres infértiles (75).

Profilaxis de tromboembolias postoperatorias en neurocirugía (76) en inhibición de adhesiones de tendones (77), pericardiales (78).

Prevención de trombosis venosa en cirugía de calera con Dextrano 40 y 70 (79). Hemodilución en pacientes con isquemia de úlceras de piel - (80). Tratamiento de úlceras (81). Estabilizador de materiales congelados desecados sensibles como vacunas y bacterias con Dextranos de 10,000 a 30,000 de Peso Molecular. (1)

CAPITULO 2
OBTENCION DE DEXTRANOS

OBTENCION DE DEXTRANOS

2.1).- Historia.

El interés en los polisacáridos biosintetizados se originó hace más de un siglo, con el problema que se ocasionaba en el proceso industrial del azúcar. En 1822 se reportó que el jugo de caña después de ser almacenado había cambiado a forma mucilaginosa espesa y no se podía utilizar, y en 1861 Pasteur describió fermentaciones de la sacarosa debido a dos bacterias fermentadoras organizadas.

Scheibler, en 1869, le llamó a la goma "Dextrano". En 1931 Tarr y Hibbert reportaron las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo productor del Dextrano y la producción de éste a partir de sacarosa. Hehre reportó la biosíntesis de Dextrano a partir de dextrinas de *Acetobacter viscosum* y *A. capsulatum*, como ya se mencionó con anterioridad. (3)

El producto conocido como Dextrano fué desarrollado inicialmente con los esfuerzos de Grö nwall e Ingelmann en 1944 y 1945 en Suecia. Mucho del Dextrano ahora fabricado se realiza por el método que ellos patentaron en 1948. (16)

Mientras tanto el departamento de investigaciones y desarrollo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norte América se interesaron en la producción de Dextranos.

Fuó en este mismo País donde se construyeron dos plantas comerciales para la producción de Dextrano como un expansor del Plasma sanguíneo.

Muchas otras compañías construyeron plantas piloto. Hubo muestras de interés comercial en la producción de Dextrano en Inglaterra y Suecia.

El mercado del Dextrano virtualmente se colapsó en 1955 cuando el cuerpo militar de los Estados Unidos paró la compra del expansor sanguíneo ya terminadas las guerras mundiales. Después de entonces la producción bajó a poca escala, (3) pero en la actualidad existen varios Países productores de Dextranos; el polisacárido ha resultado de gran importancia en múltiples áreas de la industria mundial.

Existen laboratorios en todo el mundo investigando constantemente algo más acerca de este importante compuesto y sus usos aumentan día a día en diferentes sectores.

2.2).- Procesos de Obtención.

Es necesario para el proceso de obtención, primeramente escoger la cepa requerida de las bacterias productoras que pueden ser: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Streptobacterium*, *Acetobacter* y *Betabacterium* entre otras (3). La cepa internacionalmente usada para la producción del Dextrano clínico es la NRRL B 512 F.

En cuanto a medios de cultivo Jeanes reportó en sus estudios con varias condiciones de crecimiento, un medio constituido de 10% de sacarosa, 0.5% de fosfato ácido de potasio, 0.25% de extracto de levadura, 0.1% de cloruro de sodio, 0.06% de sulfato de amonio y 0.2% de sulfato heptahidratado de magnesio. (3) Mientras que McCleskey, Faville y Barnet usaron como medio de aislamiento para *L. mesenteroides*, jugo de caña de azúcar a 10-18°C: tripticasa 10 grs., extracto de levadura 5 grs., azúcar cruda 100 grs., agar 20 grs., agua destilada 1000 ml., hasta llegar a un pH de 6.7.

Los Dextranos pueden ser producidos por fermentación o por un proceso que involucra la preparación de Dextranucrasa bajo condiciones óptimas para su elaboración, seguida de una síntesis enzimática. En ambos procesos es necesario un proceso de fraccionamiento para separar el Dextrano clínico. El proceso enzimático tiene la ventaja de producir directamente un porcentaje razonable del Dextrano con un Peso Molecular promedio en el rango clínico siendo menos complicado por esta razón. (16)

2.2.1).- Preparación en el Laboratorio. (1)

La composición del medio establecido eficazmente para el crecimiento del inóculo y para la producción de Dextrano a escala de laboratorio a partir de cepas de *Leuconostoc* es, en gramos por litro de agua destilada: sacarosa 100.0, extracto de levadura 2.5, sulfato de magnesio o heptahidratado 0.20, fosfato dibásico de potasio 5.0.

El fosfato se esteriliza por separado y es añadido asepticamente a la solución estéril y fría de los otros ingredientes. El pH de la mezcla inicial es de cerca de 7.0.

Para iniciar el desarrollo del inóculo, se transfiere una pequeña cantidad de la cepa en crecimiento en 125 ml de medio de cultivo de sacarosa y agar estériles en un matraz Erlenmeyer de 300 ml de capacidad

incubando a temperatura ambiente que no exceda de 25°C con su agitador correspondiente por un periodo de 16-48 hrs., dependiendo de la cepa. Una fuerte viscosidad y turbidez indican un buen crecimiento. El determinante crítico del período de incubación es el pH, el cual disminuye durante la incubación debido a la formación de ácido láctico; la actividad de una cepa es dispereja si el pH llega a menos de 4.8. El cultivo en el matraz de 300 ml se transfiere a uno de 750 ml, agregando 500 ml de medio de cultivo estéril, incubando por otras 16-48 horas, a 25°C, con agitación manual casual. Se pueden inocular grandes volúmenes en estas mismas condiciones. La producción del Dextrano es completa cuando la viscosidad del medio llega a su punto máximo o su valor se hace estable, y cuando el pH llegue a 4.8.

Si el Dextrano es soluble en agua y su fermentación terminó, primeramente se diluye en un volumen igual de agua y después etanol hasta hacer 35% en volumen. La solución se centrifuga para quitar las células incrementando gradualmente la concentración de etanol (usualmente al 42-45%) para precipitar el Dextrano. El sobrenadante puede ser removido del Dextrano por decantación o centrifugación, el Dextrano es purificado por reprecipitación, y 1-3 lavados con una solución acuosa de etanol al 5%. El Dextrano puede ser deshidratado por adición de una solución de etanol absoluto, lavando el precipitado con etanol absoluto, y secándolo sobre cloruro de calcio o un sólido polvoso. En alternativa puede ser desecado por liofilización. La recuperación y purificación de Dextranos no solubles en agua requieren de métodos modificados.

2.2.2).- Fermentación industrial

El proceso industrial de fermentación aquí descrito es de un reporte de una planta industrializada productora de Dextrano en los Estados Unidos de Norte América (82).

2.2.2.1).- Proceso en breve.

Se utiliza *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 - F como cepa fermentadora. Este microorganismo fermenta un medio que contenga sacarosa, minerales, vitaminas y agua para dar un Dextrano que es precipitado y separado del licor de fermentación para ser hidrolizado parcialmente con ácido clorhídrico, para dar un producto con Peso Molecular fluctuante entre 75,000 ± 25,000. Se utiliza metanol para separar las fracciones del IM desecado de

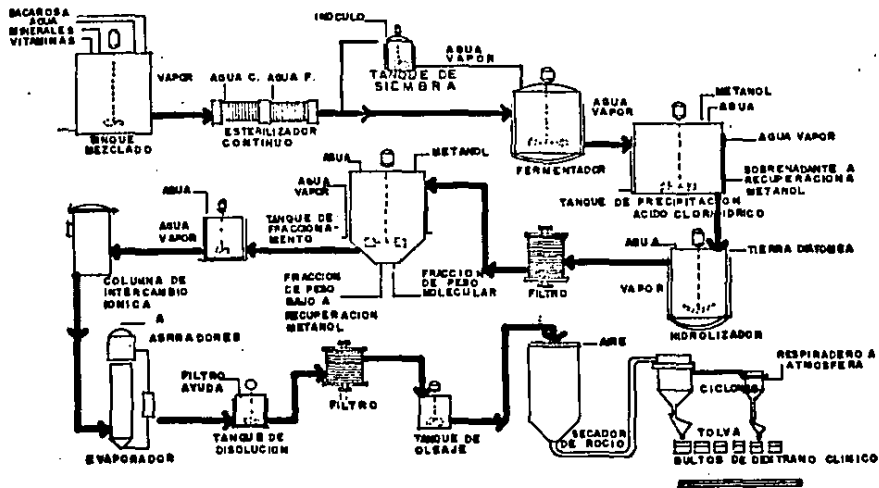


Fig. 2.1 Diagrama de flujo de la obtención microbiológica de Dextrano por fermentación industrial.

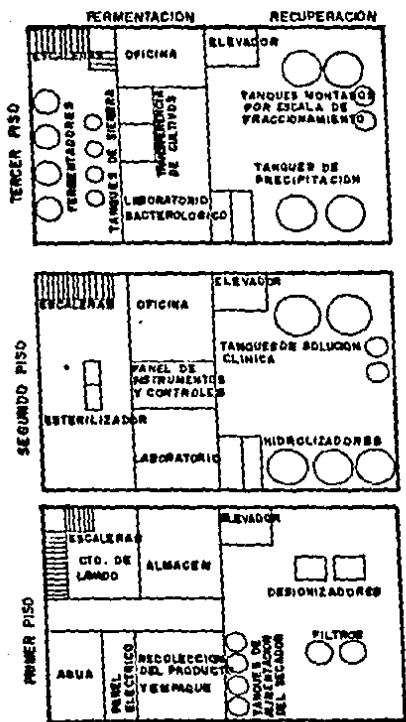


Fig. 2.2 Planos por piso del edificio productor de Dextrano clínico.

aquellas con pesos más altos o menores. La fracción es purificada, concentrada, secada, empacada, analizada y finalmente procesada para uso de expansor del volumen plasmático y otros usos.

2.2.2.2).- Proceso en detalle.

Un diagrama de flujo (Fig.2.1) muestra el proceso comercial de obtención. Para poder prevenir contaminación innecesaria del aire en el edificio de procesamiento, la materia prima y el tanque de preparación del medio de cultivo están localizados en un edificio adyacente.

La materia prima es pesada y colocada en un tanque de preparación de medio de cultivo de 1,500 gal. de capacidad, produciendo un volumen total de 1,060 gal. El contenido es agitado y la temperatura se lleva hasta 60°C por medio de calor proporcionado por el saco o chaqueta de vapor del tanque.

La solución es llevada por bombeo al segundo piso del edificio central (Fig. 2.2) donde es esterilizado en un intercambiador de calor de dos secciones. El medio es calentado a 142°C por circulación de agua a 150°C (bajo presión) en un lado del intercambiador. En la segunda sección el medio se enfría a 25°C \pm 0.5°C. Para hacer crecer el inóculo se utiliza un tanque llamado Bazooka (Fig. 2.3) de 10 gal. y acero inoxidable que se encuentra en el cuarto de cultivo. El contenido de la Bazooka se mantiene a una temperatura uniforme por el uso de baños de temperatura constante.

El inóculo es transferido de la Bazooka al tanque de sembrado a través de líneas de acero inoxidable, flexibles, esterilizadas por vapor por medio de aire estéril bajo presión. El inóculo del tanque de sembrado es llevado enseguida al fermentador de 300 gal. por aire estéril.

Ambos tanques tienen un agitador que ayuda a proveer la temperatura uniforme. Durante la fermentación, el pH disminuye debido a la producción de ácidos orgánicos y la viscosidad del medio aumenta debido a la síntesis del Dextrano. Para poder asegurar un buen control, se toman muestras cada 2 horas. Cuando el pH llegó hasta 4.5, la síntesis se considera como terminada. La viscosidad en este punto puede estar entre 400 y 700 c.p.

El medio gastado que contiene Dextrano, azúcares no fermentados, productos de fermentación como ácido acético, láctico, etanol y otras sustancias, es bombeado a un tanque de precipitación de 2,400 gal., donde después de mezclar y ajustar el pH, se agrega una cantidad aproximadamente igual de metanol (en este punto se controla la temperatura con un rango de 1°C). Casi todo el Dextrano es precipitado con el metanol. Después que se les ha --

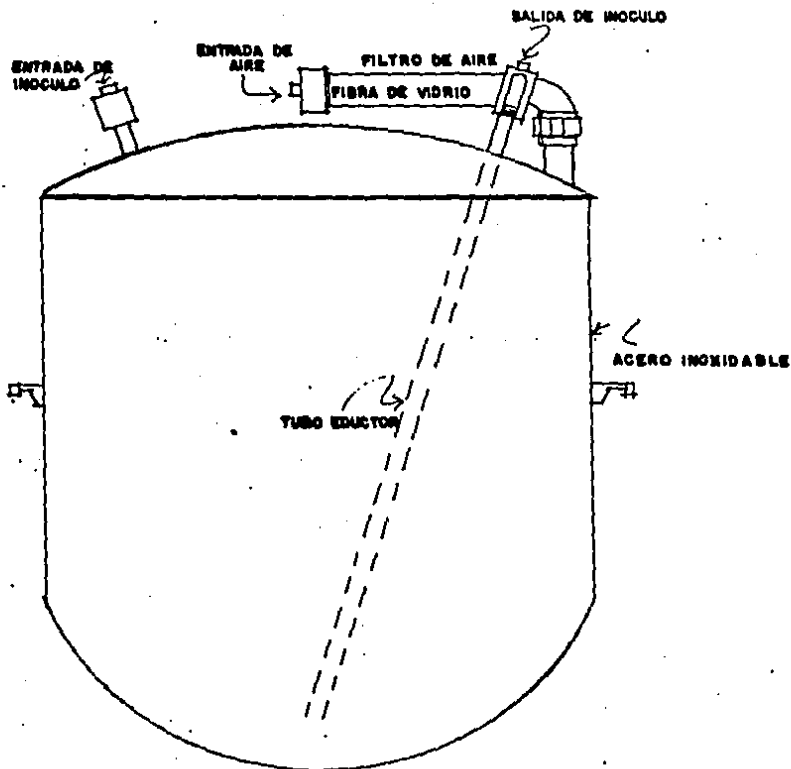


Fig. 2.3 Bazooka, aparato diseñado para el crecimiento del inóculo en el proceso fermentativo industrializado de la producción del Dextrano.

permitido a los sólidos el precipitar, el sobrenadante es bombeado a un tanque de almacenamiento de 4,000 gal., en el piso inferior en el área de recuperación de metanol.

El Dextrano nativo precipitado es redisoluelto en agua libre de pirógenos (equivalente a agua bidestilada, y teniendo menos de 1.5p.p.m. de sólidos totales) a una temperatura de 60 a 70°C. La precipitación del Dextrano es realizada por segunda vez con metanol, para remover todas las posibles impurezas que pudieron escaparse en la primera precipitación. Los sobrenadantes también se bombean abajo al tanque y el dextrano es redisoluelto en agua libre de pirógenos a 50 a 70°C.

La solución de Dextrano es bombeada a un hidrolizador lineal de vidrio de 1,000 gal. de capacidad. Se añade agua libre de pirógenos hasta llenar el tanque. El calor y el aspirado se aplican para remover toda traza de metanol. Se añade ácido clorhídrico medido con anticipación y la temperatura de hidrólisis se mantiene entre 100 y 105°C. por la aplicación de vapor a la chaqueta o saco del hidrolizador.

Se controlan la temperatura y el tiempo de la hidrólisis, basados en datos de las medidas de viscosidad realizadas. Se hacen seis o más lecturas hasta que llegue a una viscosidad de 10 c.p. Entonces se realizan lecturas cada 5 min., y se colocan los datos en papel en una gráfica semi logarítmica, y se calcula el punto exacto de terminación de precipitación.

La tasa de hidrólisis va disminuyendo por el enfriamiento de la solución, hecho de tal forma que la viscosidad de la solución después del enfriamiento y la neutralización con hidróxido de sodio sea menor de 5 c.p.

Se añaden 35 libras de tierra de diatomea al hidrolizador. El material es entonces bombeado a través de un filtro de platos para purificar y de aquí llevado a un tanque de fraccionamiento de 1800 gal. de capacidad. La temperatura del tanque es controlada con 1°C de diferencia lo que significa la utilización de una chiqueta de control de temperatura y un agitador.

Se añade un Peso calculado de metanol a la cantidad previamente pesada de Dextrano en solución. Se agita continuamente durante y después de agregar el metanol, el Dextrano de alto Peso Molecular es precipitado por lo que se deja de agitar para que las partículas vayan al fondo del tanque para ser removidas después. Se reanuda la agitación y se agrega metanol -

pesado, una vez más en el tanque. Entonces los Dextranos de Pesos Moleculares de 25,000 a 20,000 (rango clínico) se precipitan esta vez. Se dejan caer en un tanque de disolución colocado en el piso inferior, y las fracciones que permanecen en el sobrenadante de la solución de metanol, - la mayoría de Peso Molecular más bajo, se llevan por bombeado al tanque de recuperación de metanol.

Se agrega agua libre de pirógenos al Dextrano de rango clínico para redisolverlo en el tanque, así se reduce la viscosidad facilitando el bombeo. Este material es bombeado a un tanque de fraccionamiento de 750 gal. que está colocado sobre básculas y está localizado en el piso superior de la planta, aquí se repiten los fraccionamientos para dividirlos en fracciones altas y las destinadas para uso clínico. El material clínico se deja caer al segundo piso para redisolver en un tanque de 300 gal. de capacidad. Se agrega agua libre de pirógenos para disminuir su viscosidad de la solución y poderla llevar rápidamente a través de una columna desionizante. La solución de Dextrano desionizado es bombeado a un tubo evaporador que contenga 60 pies cuadrados de superficie para transferencia de calor. Se agrega filtro ayuda (aproximadamente el 5%) a la solución concentrada mezclándolos en un tanque para disolverlos.

La mezcla es pasada por un filtro. La solución es bombeada a un tanque de alimentación del secador de rocío, de 100 gal. El secador de rocío representa el último paso del proceso. La solución de Dextrano concentrada es pasada a través de un disco atomizador, de 5 pulgadas de diámetro, que está localizado en la parte superior de la cámara secadora de 7 pies. El disco rota a 21,000 r.p.m. y dispersa el Dextrano e gases entrantes. El Dextrano permanece en contacto con el medio caliente cerca de 5 seg, y su temperatura no excede de los 92.2°C. La solución se reduce a polvo (con una humedad del 14) y es recolectada en una serie de cuatro separadores o ciclones, que están montados paralelamente. El material se deja caer a una tolva central para ser empacado.

El Dextrano es altamente hidrocófico. Consecuentemente debe ser empacado en contenedores que provean la protección adecuada contra la absorción de humedad. Tambores de fibra alineados con polietileno, conteniendo una barrera de aluminio en la pared, y equipados con tapas de corchete con empaque de caucho se han utilizado para este fin.

El material se retiene hasta que todas las pruebas de laboratorio - indiquen que se cumplen todas las especificaciones requeridas. Después de lo cual puede embotellarse, acción que puede ser realizada por separado en otra planta.

El Dextrano es disuelto en agua libre de pirógenos, su concentración se ajusta al 6% (6grs. por 100 mls.), añadiendo cloruro de sodio para proporcionar una concentración final del 0.9%; y se filtra la solución.

Suficiente de esta solución es introducida en botellas tipo plasma - comercial para proceder a su envío de 500 mls. El aire se saca de la botella, que es sellada y tapada. La botella es enviada a esterilizar por calor, así haciendo su contenido clínicamente usable. Por último es empaquetado con el equipo requerido de inyección.

2.2.3).- Síntesis Enzimática. (16) .

2.2.3.1).- Proceso en breve.

El proceso para la síntesis enzimática del Dextrano involucra:

- 1.- la producción de dextranasa; 2.- remover las células de las bacterias del medio de producción; 3.- la síntesis del Dextrano en una -- reacción mezclando sacarosa, dextranasa, bajo condiciones muy controladas; y 4.- fraccionación y purificación del Dextrano.

2.2.3.2).- Proceso en detalle.

La producción de la dextranasa se reportó desde 1952 por Koepsel y Tsuchiya, a partir de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512, desarrollando un medio para la producción de la enzima que contenía: 2% de sacarosa, 2% de licor de macerado de maíz (base seca), 0.1% de fosfato diácido de potasio y 0.5% en volumen de sales R (4% de sulfato deptahidratado de -- magnesio, 0.2% de cloruro de sodio, 2% de sulfato ferroso heptahidratado y 0.2% sulfato de magnesio monohidratado).

El pH de 5 a 5.2 da estabilidad a la actividad enzimática y debe ser mantenido durante las 24 hrs. de producción a temperatura constante, que debe ser de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ya que temperaturas mayores aceleran la destrucción de la actividad enzimática. Se requiere aereación suave para favorecer la producción de la dextranasa. Esta puede ser obtenida de agitadores o pasando 0.05 volumen de aire por volumen del medio por minuto a tra vez del sustrato con agitación moderada.

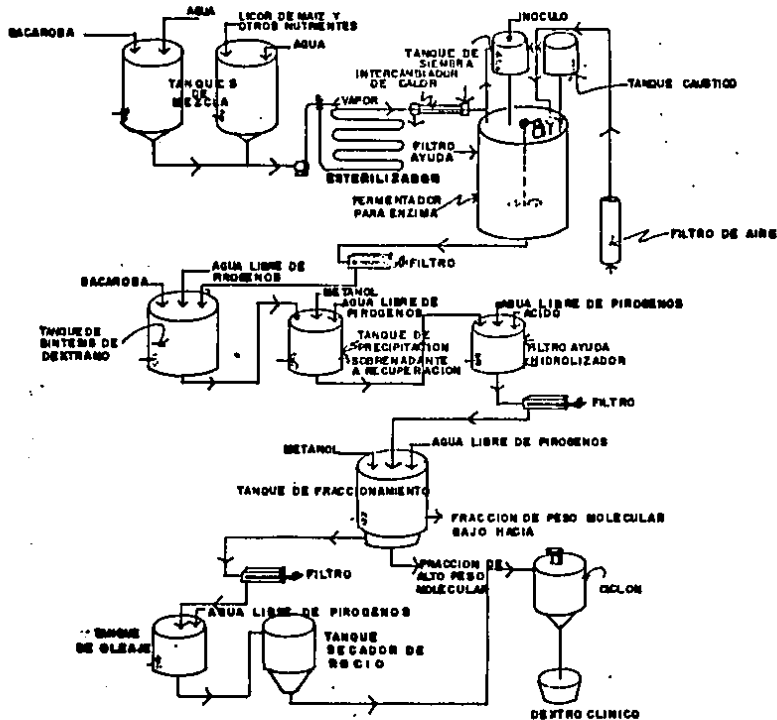


Fig. 2.4 Diagrama de Flujo de síntesis enzimática de Dextrano.

La concentración del 2 % parece ser la óptima, ya que concentraciones mayores incrementan la cantidad de Dextrano y la dificultad de remover las células muertas. Los líquidos libres de células bacterianas se obtienen pasándolos a través de centrifugación y posteriormente por un filtro Seitz.

El proceso de fermentación enzimática se llevó a 25°C con aereación moderada y por periodos de 12 horas o menos.

Cuando el proceso se terminó debe haber 40 dextranucrasas en unidad por ml. de licor. Una unidad de dextranucrasa es la cantidad de enzima necesaria que convertirá 1 mg. de sacarosa a Dextrano en 1 hora a 30°C y a un pH 5 en una mezcla conteniendo 10% de sacarosa, M/20 buffer de acetato, y el cultivo centrifugado.

Para remover las bacterias, se utilizan filtros Seitz de membrana - ajustándose el pH a 5 ó 5.2 que le da la estabilidad máxima a la enzima para ser almacenada hasta 30 días a 15°C sin ningún problema.

Síntesis del Dextrano. Tsuchiya y asociados en 1955, (16) reportaron la relación entre la concentración de sacarosa y el Peso Molecular obtenido del Dextrano. Cuando las concentraciones fueron mayores del 5 al 20% la cantidad y Peso Molecular del Dextrano disminuyen, mientras -- que los Dextranos producidos a una concentración del 70% de Sacarosa, -- fueron de Peso Molecular muy bajo, y los producidos a una concentración del 10% dieron de alto Peso Molecular. Las concentraciones ordinariamente utilizadas de enzima fueron de 20 a 40 unidades de dextranucrasa por ml. incrementando la concentración de la enzima a cerca de 30°C, favorece la producción de Dextrano de Peso Molecular bajo.

Después que se completa la síntesis, se añade metanol hasta concentraciones del 50% en volumen, para propósitos de precipitar el Dextrano así que la mezcla se agita durante la adición para prevenir concentraciones altas locales de alcohol. Se deja precipitar por 4 hrs. aproximadamente; el sobrenadante que contiene fracciones de Peso Molecular bajo, - se envía al area de recuperación de metanol. El Dextrano crudo es disuelto en agua libre de pirógenos, y se añade metanol para llegar a una concentración de 50% en volumen, lo que origina la precipitación del Dextrano.

Por último se procede a la fraccionación o hidrólisis para dar Dex-

transos cruzos o los clínicos. Todo el proceso anterior se describe en la Fig. 2.4.

2.3).- Control de calidad de Dextranos clínicos.

2.3.1).- Especificaciones.

El Dextrano clínico envasado debe cumplir ciertas especificaciones en los Estados Unidos de Norte América según las especificaciones de la Fuerza Aérea. La tabla siguiente muestra las especificaciones deseadas: (16) (83).

PROPIEDAD	VALOR EN SOLUCION AL 6%
Contenido de Dextrano g/100 ml.	5.7 - 6.3
Cloruro de sodio	0.85 - 0.95
pH	5.0 - 7.0
Color	menor al APHA 50
Metanol	menos de 20 mg/100 ml.
Viscosidad c.p. a 25°C	2.5 - 3.5
Nitrógeno (max.), mg/100 ml	1.0
Metales pesados mg/100 ml	0.5
Ceniza mg/100 ml	0.056
Peso Molecular	75,000 ± 25,000
Viscosidad intrínseca dl/g	0.23 ± 0.05
Capacidad Buffer (max.), ml de 0.100N de NaOH/100 ml.	3.0
Toxicidad	Negativa
Pirogenicidad	Negativa
Antigenicidad	Negativa
Esterilidad	Negativa

Tabla 2.1 Especificaciones del Dextrano clínico industrializado requeridas por la Fuerza Aérea de los Estados Unidos de Norte América, para controles de calidad.

2.3.2).- Fases de Control.

La calidad de un producto se define como la aptitud de su uso. Por lo tanto un buen control de calidad se basa en las demandas y;

deseos del consumidor. En términos farmacéuticos se puede decir que se expresa en términos de eficacia, aceptabilidad y seguridad. (84)

Idealmente la administración de los expansores de Plasma debe resultar predecible y reproducible. La duración de estos efectos también es una medida de calidad. (84)

Ha habido gran dificultad para evaluar los resultados de investigaciones realizadas con Dextranos ya que existen muchas compañías que lo fabrican, con diferentes métodos y por lo tanto diferentes propiedades.

Por ejemplo el Macrodex o Dextrano 70 se fabrica por Pharmacia en Suecia; Knoll AG. en Ludwigshafen fabrica Dextrano 60 que también es llamado Macrodex; existiendo otros productores como Cutter en Berkeley, Don Baxter en Glendale, Travenol en Morton Grove, Vifor S.A. en Genova, etc.

Tenemos Dextrano 75,000 fabricado por Abbott y Pharmacia en Suecia, por L'Equilibre Biologique en Paris, Knoll AG. en Ludwigshafen y Abbott en Chicago. (5)

El control de calidad de cada fábrica es diferente pero similar en conjunto, por lo que aquí incluiremos el control de Pharmacia en Suecia, que se clasifica en cinco fases principales.

2.3.2.1).- Determinación de Peso Molecular.

Realizados por análisis de grupos terminales con técnica colorimétrica o por dispersión de la luz.

2.3.2.2).- Determinación de la distribución de los Pesos Moleculares.

Realizada en cromatografía en gel con Sephadex.

2.3.2.3).- Control de Esterilidad.

La esterilización se realiza a vapor, en autoclave en torre, en flujo continuo. Donde se deben vigilar la temperatura, y el tiempo del ciclo. Para el control de no toxicidad se utiliza el autoclave en torre para eliminar las esporas de *Bacillus thermohemophilus*, una de las bacterias más termorresistentes conocidas.

2.3.2.4).- Control de pirógenos.

Los pirógenos, producidos por la descomposición de las bacterias muertas, son potentes materiales antigénicos que producen fiebre cuando se inyectan, aún cuando son muy escasos. Las pruebas se realizan con conejos y termómetros muy sensibles al cambio de temperatura colocados en el recto, después de haberlos inyectado con la muestra.

2.3.2.5).- Control Químico.

Otras impurezas como azúcares reductores, hasta los metales pesados que son tan tóxicos pueden ser detectados por espectrometría en infrarrojo y la cromatografía de gases.

CAPITULO 3
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

3.1).- Objetivos.

El plan de trabajo se resume dentro del Diagrama de flujo (Fig. 3.1), el que se divide en dos partes principales:

- a) Obtención de la cepa microbiana.
- b) Obtención e identificación del Dextrano.

3.2).- Obtención microbiológica.

3.2.1).- Materiales y Reactivos.

Cajas petri	Caña de azúcar
Portaobjetos	Agua destilada
Asas	Aceite de inmersión
Mechero	Agar
Microscopio	Medio de Tarr & Hibbert * (85)
Tubos de ensayo	Coloración de Gram *
Gradilla	Prueba de Catalasa *
Matraces Erlenmeyer	Prueba de Sacarosa *
Refrigerador	Prueba de Arabinosa *
Tapones de Algodón	Prueba de Manitol *
Olla Express	S.I.M. *
Prueba de Kligler *	Prueba de licuefacción de la gelatina *

* para ver preparación ver apéndice.

3.2.2).- Método.

Obtención de caña de azúcar.

Se obtiene caña de azúcar madura fresca y recientemente cortada.

Preparación de medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado es de Tarr & Hibbert (85), se siguen los pasos enlistados en el apéndice para su elaboración, y esterilizado, usando medio sólido para cajas petri y tubos inclinados.

Preparación y siembra en medio de cultivo.

Se lava la caña de azúcar exteriormente con agua destilada, retiran do los residuos de tierra y polvo. Se hacen cortes de aproximadamente 1 cm. de ancho por 1.5 cm. de largo y 1 cm. de profundidad; de la parte pró

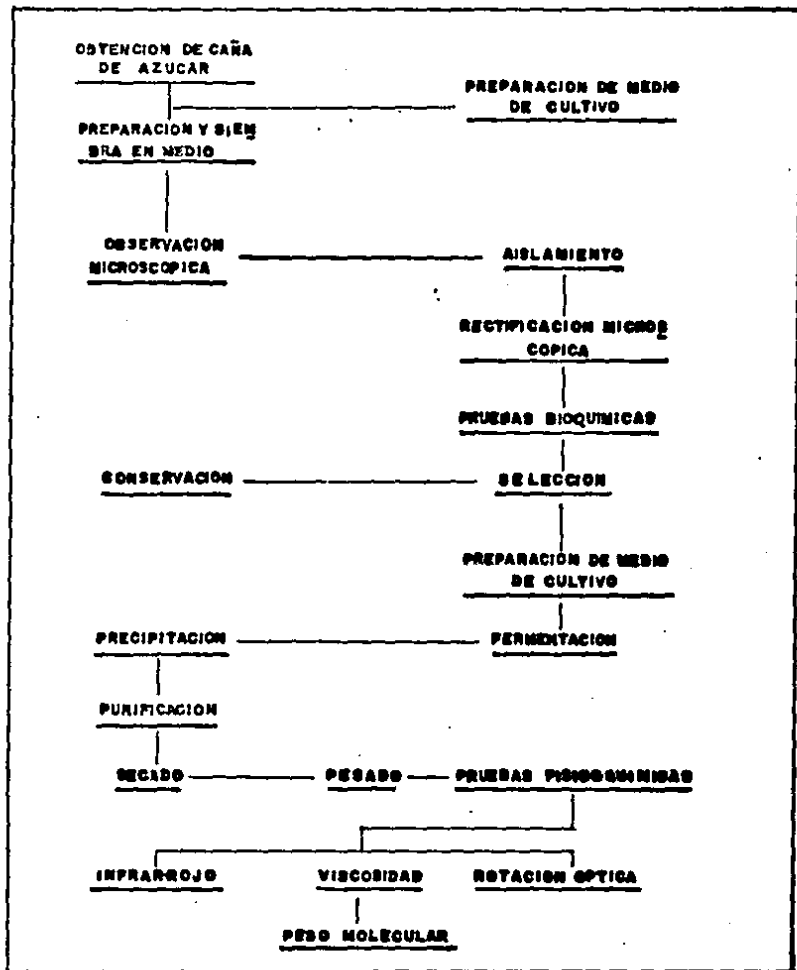


Fig. 3.1 Diagrama de Flujo del plan de trabajo experimental.

xima (30cms. por arriba) de la raíz.

Se colocan en tubos con agua destilada y se dejan reposar por 24 horas a Temperatura ambiente. Se toma del líquido una pequeña cantidad con el asa y se siembra por aislamiento en cajas petri con agar sólido de -- Tarr & Hibbert, incubando 24 horas a Temperatura ambiente.

Se realiza la observación microscópica de las posibles cepas de Leuconostoc, buscando colonias gris-crema, brillantes, mucilaginosas, redondas, de borde entero, tamaño regular, ligeramente elevadas. Haciendo frotis teñidos con la técnica de Gram (apéndice para preparación). Observar en 100X con aceite de inmersión.

Aislamiento.

Se siembra en agar Tarr y Hibbert inclinado en tubos incubando 24 horas a Temperatura ambiente; las cepas que presenten crecimiento sin contaminantes se chequean por observación microscópica y frotis teñidos con Gram.

Se practican pruebas bioquímicas a las cepas aisladas. Existen pruebas diferenciales para cada especie. (Tabla 3.1)

Selección del microorganismo Leuconostoc mesenteroides.

En el manual de Bergey (86) (87), dentro de los cocos gram positivos se clasifican en la familia Streptococcaceae el género Leuconostoc, primeramente observado por Tieghem en 1878 y más tarde por Hucker y Pederson en -- 1930.

Leuconostoc viene de leucus = claro, luz; nostoc nombre genérico de alga que en conjunto significa alga incolora.

Las células suelen ser esféricas o en forma de lenteja particularmente en agar, usualmente en pares o cadenas. No es móvil, Gram positivo (88).

No formadores de esporas. La colonia es pequeña usualmente menores de 1 mm. de diámetro, suaves redondas, blancogrisáceas. (89)

Su crecimiento depende de la presencia de un carbohidrato fermentable en donde la glucosa es fermentada con la producción de ácido láctico, etanol, y CO₂. No fermentan rhamnosa, inulina, glicerol, sorbitol e inositol.

El género Leuconostoc se divide en seis especies:

mesenteroides, dextranicum, paramesenteroides, lactis, cremores y oenos.

El Leuconostoc mesenteroides quiere decir en forma de mesenterio.

Son esferas o células en forma de lenteja, de 0.5-0.7 por 0.7-1.2 micrómetros; encontradas en pares o cadenas usualmente cortas.

PRUEBA	L E U C O N O S T O C					
	mesento- roides	dextra- nicum	paramesen- teroides	lactis	cremo- ris	oenos
Acido de:						
Arabinosa	+	-	d	-	-	d
Fructuosa	+	+	+	+	-	+
Galactosa	+	d	+	+	d	d
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	(d)	+	(d)	+	+	-
Maltosa	+	+	+	+	d	-
Manitol	d	d	(d)	-	-	-
Ribosa	+
Sacarosa	+	+	+	+	-	-
Hid. de esculina	d	d	d	-	-	+
Form de Dextrano	+	+	-	-	-	-
Citrato	d	d	d	d	+	d
Crecimiento en						
NaCl 3.0%	+	d	d	d	-	.
6.5%	d	-	d	-	-	.
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-

+ = mayor del 90% de las cepas son positivas; d = 10-90% de cepas positivas;
 - = mayor del 90% de las cepas son negativas; () = reacción retardada; . = no conocido resultado.

Tabla 3.1 Relación de diferentes pruebas de las especies de Leucostoc para su identificación.

Rango de Temperatura de crecimiento de 10-37°C, óptimo de 20-30°C, encontrado en soluciones pegajosas de azúcar, frutas, vegetales, leche y productos lácteos.

Se considera microaerófilico (89)

No es tolerante a pH bajo (90)

Existen un gran número de pruebas bioquímicas que pueden realizarse para la identificación del microorganismo pero hasta 1972 era muy sencillo identificar las tres especies hasta entonces clasificadas (86)

I Productores de ácido a partir de Sacarosa

a) Acido de pentosas

L. mesenteroides

b) Sin ácido de pentosas

L. dextranicum

II No productores de ácido a partir de sacarosa

L. citrovorum

Ahora tenemos la siguiente clasificación (89):

Acido producido a partir de:

<u>ESPECIE</u>	<u>Arabinosa</u>	<u>Xilosa</u>	<u>Glucosa</u>	<u>Manosa</u>	<u>Lactosa</u>	<u>Sacarosa</u>
L. cremoris	-	-	+	-	+	-
L. dextranicum	-	v	+	v	+	+
L. lactis	-	-	+	v	+	+
L. mesenteroides	+	v	+	+	v	+
L. paramesenteroides	v	v	+	+	v	+

v = variable.

Con la diferencia entre L. paramesenteroides y L. mesenteroides que el primero no produce Dextrano, y que el segundo junto con L. dextranicum son las dos especies productoras de Dextrano. La prueba de la Arabinosa es muy útil para el aislamiento de la cepa de L. mesenteroides.

Conservación.

Para conservar las cepas se pueden refrigerar tubos de medio de Tarr & Hibbert sólido inclinados sembrados y en cantidad suficiente de crecimiento. Resembrando cada 2 ó 3 meses.

3.3).- Proceso fermentativo.

3.3.1).- Materiales y reactivos.

Matraces Erlenmeyer	Medio de Tarr & Hibbert *
Fermentador	Isopropanol
Olla Express	Agua destilada
Manguera	Solución Soxhlet *
Algodón	Tubos de ensayo
Tapón de plástico	Tapones de gasa y algodón
Tubos de vidrio	Papel aluminio
Estufa de calor seco	Bomba de aire
Pipetas de 10 mls.	Mechero
Vasos de precipitado	Soporte universal
Pinzas	Probetas
Bureta de 50 mls.	Pesquímetro
* ver apéndice para preparación.	Centrífuga

3.3.2).- Método.

Se prepara medio de cultivo Tarr & Hibbert líquido siguiendo los pasos de preparación del apéndice. Se toma una porción pequeña en un matraz Erlenmeyer y después de esterilizarse se inocula con *L. mesenteroides* incubando a Temperatura ambiente durante 24 hrs.

Se arma el aparato de fermentación que consta de un frasco fermentador de vidrio con tapón de algodón y gasa, salida en la parte inferior -- donde se coloca un tapón de plástico por el que se introduce un tubo de vidrio conectado a una manguera, que a su vez se fija a una bomba de aire la cual provee el aire suficiente para que el burbujeo produzca la agitación necesaria. Se coloca un filtro de algodón en el paso de aire.

El equipo es lavado y esterilizado antes de la fermentación. Se introduce medio de cultivo estéril y frío al fermentador. Se añade el matraz Erlenmeyer previamente sembrado e incubado. Se enciende la bomba de aire y se deja fermentar durante 24 horas aproximadamente; mientras tanto se realizan pruebas de control para determinar el tiempo óptimo de fermentación.

Las pruebas de control se dividen en tres:

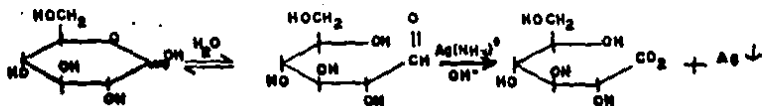
- 1) Prueba de precipitación.
- 2) Prueba de Azúcar reductor.
- 3) Prueba de pH.

1) Prueba de precipitación.

Muestras de alícuotas de 10 mls. son tomadas del fermentador a diferentes lapsos de tiempo, añadiendo 10 mls. de isopropanol. Observar la cantidad de precipitado después de dejar en reposo para que el posible Dextrano se sedimente.

2) Prueba de azúcar reductor.

Un azúcar reductor es uno que contiene un grupo aldehído o un grupo alfa hidroxicetona. Un grupo aldehído se oxida con facilidad a grupo carboxilo. Los azúcares susceptibles de ser oxidados por agentes oxidantes suaves tales como el reactivo de Tollens o el de Soxhlet, se denominan azúcares reductores. Las formas hemiacetálicas cíclicas de todas las aldosas se oxidan con gran facilidad por que están en equilibrio con la forma aldehídica de cadena abierta, como se muestra a continuación: (91)



La glucosa y la lactosa son azúcares reductores no así los glicósidos - como el Dextrano o como la sacarosa que es un azúcar no reductor.

Para la prueba se prepara solución Soxhlet siguiendo los pasos del apéndice. Se hacen titulaciones de estándares de Glucosa como patrón, colocando 10 mls. de solución Soxhlet y 1 ml. de solución estándar, se calienta hasta ebullición y se agregan 4 gotas de Azul de metileno. Se hacen titulaciones - agregando solución estándar medida con bureta hasta que ocurra el cambio de color. Así se obtiene el factor de titulación de la solución Soxhlet que -- nos indica cuantos grs. de glucosa se titulan por cada ml. de solución de -- Soxhlet. Dentro del fermentador existe Dextrano formado, sacarosa y fructuo sa libre, siendo ésta última la única titulable como azúcar reductor.

Se repite el procedimiento para la solución problema, tomada del fermentador a intervalos irregulares de tiempo, determinando una relación entre -- tiempo en horas y cantidad de azúcar reductor presente en gramos por ml.

3) Pruebas de pli.

Se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo del fermentador y se mide el pli de la substancia con penchímetro. Los microorganismos en la fase fermentativa forman diferentes ácidos que hacen que el pli descienda considerablemente. Muchos autores consideran al pli= 4.6 como el cual indica que la fermentación de la sacarosa se completó.

Precipitación.

La fermentación es detenida por la agregación de isopropanol, después de aproximadamente 24 hrs.; la precipitación se da en éste momento por iniciada para así empezar el proceso de recuperación y purificación del Dextrano. El volúmen añadido es igual al líquido fermentado; menos alcohol - no precipita todo el Dextrano existente.

Prueba de control.

En una prueba previa para ver si el producto obtenido es Dextrano se toma líquido filtrado y lavado y se centrifuga en tubos, decantando y lavando con isopropanol. Después de dejar secar se hace análisis de infrarrojo, y se compara con una muestra patrón de Dextrano comercial. (Fi.3.2)

3.4).- Purificación e Identificación fisicoquímica del Dextrano.

3.4.1.)- Materiales y Reactivos.

Cubeta	Frascos pequeños
Vasos de precipitados	Viscosímetro
Estufa eléctrica	Termómetro
Embudo de Bushner	Agitador con aspas
Matraz kitazato	Frasco de vidrio para baño
Papel filtro	Soporte Universal
Embudo de rama larga	Pinzas
Balanza analítica	Crónómetro
Agitador	Manguera
Aparato de Infrarrojo	Agua destilada
Pipetas	Isopropanol
Mortero	Tierra de diatoma
Espátula	Dextrano patrón
Pastillero	Tetracloruro de Carbono
Polarímetro	Acetona

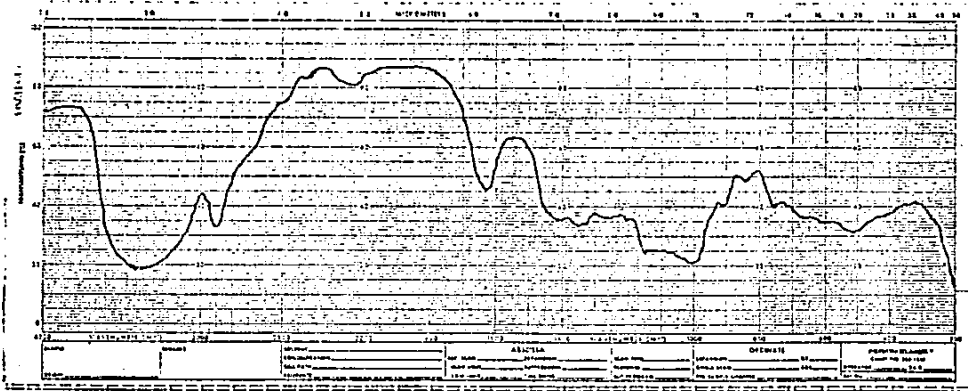


Fig. 3.2 Prueba de control. Infrarrojo de Dextrano patrón comercial.

3.4.2).- Métodos.

3.4.2.1).- Purificación.

Se decanta el sobrenadante de la cubeta y el Dextrano se redissuelve en agua destilada, y se calienta sin llegar a la ebullición. Se filtra en caliente en embudo buchner y tierra de diatomea, 2 ó 3 veces hasta -- que el líquido filtrado pase cristalino, se lava con agua destilada caliente. Se repite la precipitación con isopropanol (volumen igual al líquido), se deja reposar aproximadamente 24 hrs. Se decanta. Se repite la filtración y el lavado redisolviendo en agua caliente. Se reprecipita con isopropanol decantando posteriormente. El Dextrano obtenido se filtra en papel filtro previamente pesado y embudo de rama larga.

Se deja secar y se pesa para obtener rendimiento.

3.4.2.2).- Pruebas Fisicoquímicas.

A) Prueba de infrarrojo.

La espectroscopía de infrarrojo tiene amplias aplicaciones en análisis cualitativo y cuantitativo. Su principal utilización ha sido la -- identificación de compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen ser complejos y contienen numerosos máximos y mínimos que pueden servir para realizar comparaciones. El espectro de infrarrojo de un compuesto orgánico representa una de sus propiedades físicas características.

Con excepción de los isómeros ópticos, no existen teóricamente dos compuestos que absorban exactamente en la misma forma.

La muestra es triturada con un mortero y se agrega tetracloruro de carbono para formar una pastilla a base de presión manual, la cual se coloca en el aparato para que éste nos de la gráfica correspondiente. Se debe tener cuidado de limpiar con acetona el material utilizado.

La prueba se realiza con patrón comercial de Dextrano y con muestra.

B) Rotación óptica.

La rotación de la radiación polarizada en un plano por compuestos ópticamente activos puede variar desde varios cientos de grados hasta -- unas pocas centésimas de grado.

La rotación específica o la potencia rotatoria específica $[\alpha]_{\lambda}^T$ se emplea mucho para describir las características rotatorias de un líquido.

Se define como:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{lc}$$

donde α es la rotación observada en grados, l es la longitud de la trayectoria de la celda en decímetros, y c es la concentración del soluto en 100 ml. de solución. La longitud de onda λ y la Temperatura T suelen especificarse con un subíndice y un superíndice, como se representa.

Las rotaciones específicas se suelen medir a 20°C con la línea D del sodio y se indican como $[\alpha]_D^{20}$. Para un líquido puro, c se substituye por la densidad. Por convención, la rotación hacia la izquierda o l es -- cuando el haz se dirige hacia el observador, se representa con signo negativo y se denomina levógiro. Cuando la rotación es a la derecha o d se denomina dextrógiro o positiva.

La rotación óptica de un compuesto puro bajo condiciones específicas proporciona una constante física fundamental para fines de identificación semejante al punto de fusión, al punto de ebullición, etc.

La rotación óptica se mide con un polarímetro cuyos componentes básicos son una fuente de luz monocromática, un prisma polarizador para producir radiación polarizada, un tubo de muestra, un prisma analizador con escala circular, etc.

La medición se realiza utilizando agua como solvente, haciéndola para Dextrano patrón comercial y para muestra de Dextrano obtenido.

c) Prueba de viscosidad y determinación del Peso Molecular. (93)

Gases y líquidos poseen una propiedad conocida como viscosidad, que se define como la resistencia que una parte del fluido ofrece al desplazamiento de la otra. Los líquidos exhiben una resistencia a fluir mucho mayor que los gases y por consiguiente tienen unos coeficientes de viscosidad mayores.

La viscosidad se mide con un viscosímetro que puede ser el de Ostwald, o alguna modificación de éste pero con el mismo funcionamiento básico. Se introduce una cantidad definida de líquido en el viscosímetro inmerso en un termostato y se le arrastra por succión al bulbo hasta que el nivel del líquido se halla por encima de la marca. Entonces se permite la salida del líquido y se mide el tiempo necesario para que el líquido -descienda hasta la marca inferior. Se limpia el viscosímetro, se agrega

el líquido de referencia y se repite la operación totalmente. De esta manera tan simple se obtienen t_1 y t_2 y se calcula la viscosidad del líquido mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{f_1 t_1}{f_2 t_2}$$

La viscosidad relativa de una solución η_r , es la relación $\eta_r = \eta/\eta_0$ donde η es la viscosidad de la solución y η_0 la del solvente puro, ambas a la misma temperatura. Así mismo, la viscosidad específica está dada por $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ y la viscosidad intrínseca, $[\eta]$ por

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$$

donde C es la concentración del soluto, expresada generalmente en gramos por 100 cc de solución, ambas expresiones dan el mismo valor de $[\eta]$.

Por otra parte se ha demostrado que la viscosidad intrínseca está relacionada con el Peso Molecular por la expresión

$$[\eta] = KM^a$$

Donde K y a son constantes para polímero, solvente y temperatura determinados. Por lo tanto, una vez que se conocen K y a para una combinación específica polímero-solvente, se puede calcular M del valor determinado de $[\eta]$.

Para obtener $[\eta]$, se miden las viscosidades de varias soluciones diluidas de polímeros en un solvente y también η_0 y los datos se grafican como η_{sp}/C o como $(\ln \eta_r)/C$ contra C. La extrapolación a $C=0$, nos da la viscosidad intrínseca. (93)

CAPITULO 4
RESULTADOS

R E S U L T A D O S

4.1).- Resultados de pruebas bioquímicas y selección del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*.

Las pruebas se realizaron 2 veces con diferentes cepas.

La primera utilizando 6 cepas diferentes y usando la prueba de Kligler, sacarosa, licuefacción de la gelatina, indol-nitrito, manitol y catalasa; teniendo como resultados la tabla 4.1.

<u>CEPA</u>	<u>K L I G L E R</u>				<u>Sacarosa</u>	<u>Licue.de</u>		<u>Manitol</u>	<u>Catalasa</u>
	<u>Gluc.</u>	<u>Lac.</u>	<u>Gas</u>	<u>H₂S</u>		<u>Gelatina</u>	<u>Indol</u>		
1	+	+	+	-	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	+	-	-	+	-
3	+	+	+	-	+	-	-	cont.	-
4	+	+	+	-	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	+	+	-
6	+	+	+	-	+	-	-	-	-

El gas se presentó después de 48 hrs. Gluc.= glucosa. Lac.= lactosa.
 La prueba de indol se hizo con medio de Indol nitrito.
 La cepa No. 5 se descarta por sus resultados. La cepa 3 se contaminó= cont.
 Las cepas 1, 2, 3, 4 y 6 se llevan al proceso de fermentación.

Tabla 4.1 Resultados de Pruebas bioquímicas realizadas a 6 cepas aisladas de posible *Leuconostoc*.

La segunda serie de pruebas se realizaron a 10 cepas de posible *Leuconostoc*, practicándoseles:

Kligler, S.I.M., licuefacción de la gelatina, catalasa, sacarosa, manitol, arabinosa.

Los resultados se dan en la tabla 4.2.

Comparar resultados con tabla 3.1 para mejor referencia.

CEPA	K L I G L E R				Sacarosa	Licue.de		Manitol	Catal.	Arabinosa
	Gluc.	Lac.	Gas	H ₂ S		Gelatina	Indol			
1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
3	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
7	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
9	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
10	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Tabla 4.2 Resultados de Pruebas Bioquímicas realizadas a 10 cepas de posible *Leuconostoc mesenteroides*.

Se descartan cepas de la 7 a la 10 por sus resultados.

Las lecturas se realizaron a las 24 horas.

4.2).- Determinación de tiempo óptimo de fermentación.

4.2.1).- Precipitación.

Los tubos de fermentado agregándoles el isopropanol presentaron un precipitado regular, pudiendo observar floculación si se observaban con tra la luz.

4.2.2).- Azúcar reductor.

Los resultados de la prueba se plasman en las siguientes tablas:

ESTANDARES Conc. gr/100ml.	SOLUCION DE: GLUCOSA mls. utilizados en la titulación de 10 mls. de sln. Soxhlet.	EQUIVALENCIA en gr. de glucosa por ml. de sln. Soxhlet.
A	16.5	.00825
B	6.9	.00690
C	4	.006
D	3	.006
E	2	.006

Tabla 4.3 Titulación de estandares de glucosa.

TIEMPO EN HRS.	GRAMOS DE AZUCAR REDUCTOR TITULADOS EN 100 ml.	
	FERMENTADO "A"	FERMENTADO "B"
12	1.5272	1.68
14.3	2.688	2.8
21	5.6	6.109
26	7.75	8.33
38	8.4	9.16
48	9.16	10.08

Tabla 4.4 Titulación de 2 muestras de fermentado a diferentes lapsos de tiempo, con solución Soxhlet.

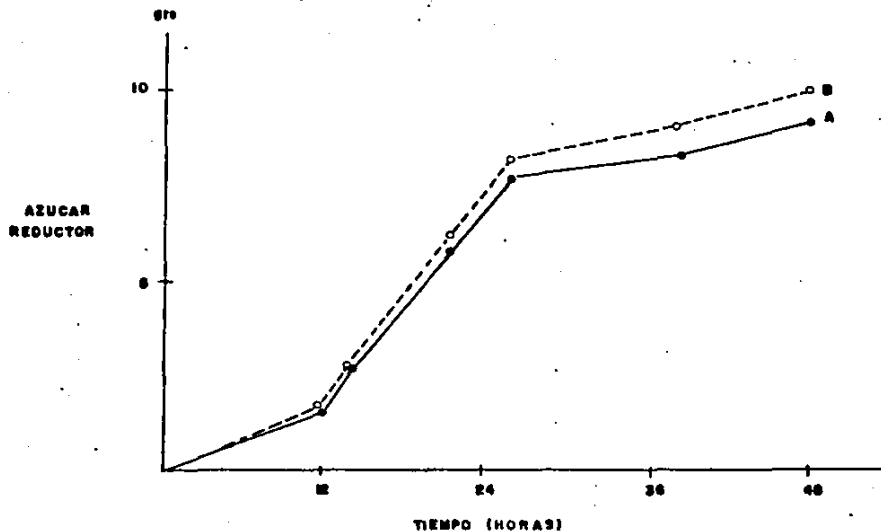


Fig. 4.1 Gráfica de azúcar reductor en 100 ml. de fermentado a diferentes tiempos. A= Fermentado de muestra "A". B= Fermentado de muestra "B".

4.2.3).- Pruebas de pH.

TIEMPO EN HRS.	pH	
	FERMENTADO "A"	FERMENTADO "B"
0	7.1	6.9
7	6.5	6.3
12	5.8	5.2
22	5.0	4.9
28	4.6	4.3
35	4.2	4.0
48	3.7	3.8

Tabla 4.5 Relación entre pH medido a 2 fermentados a diferentes lapsos de tiempo.

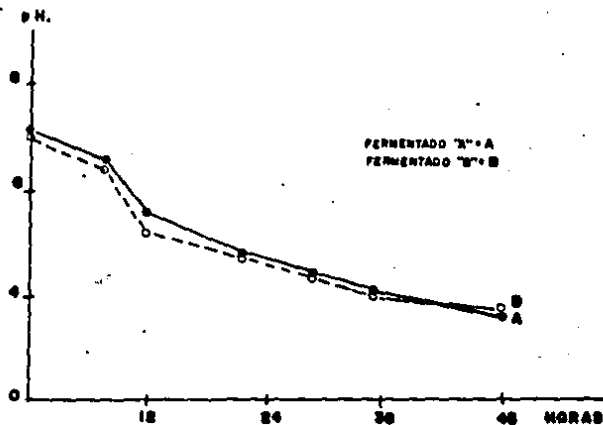
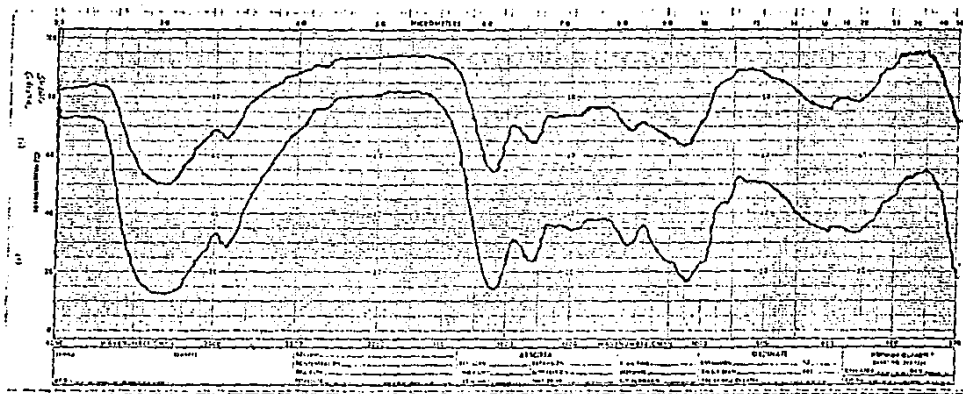


Fig. 4.2 Gráfica que muestra los datos de la relación entre el pH medido y el tiempo en horas durante la fermentación de 2 muestras.



4.2.4).- Prueba de control de Infrarrojo.

Fig. 4.3 Infrarrojo de dos muestras de Dextrano antes del proceso de recuperación y purificación.

4.3).- Resultados de Rendimiento.

Se realizaron 5 pruebas para determinar el rendimiento.

Hay que recordar que de los gramos presentes en el medio de cultivo la mitad corresponden a glucosa que formará el Dextrano y la otra mitad corresponde a la fructuosa.

PRUEBA	RENDIMIENTO EN %
A	8.86
B	5.41
C	5.20
D	3.90
E	3.54

Tabla 4.6 Rendimiento de 5 pruebas diferentes de Dextrano obtenido en el laboratorio.

4.4).- Resultados de Absorción de Infrarrojo.

Los resultados se muestran en las Fig. 4.4 y 4.5 de 3 pruebas realizadas.

4.5).- Resultados de Rotación Óptica.

ESTANDAR DE DEXTRANO COMERCIAL	CONCENTRACION grs. en 100 ml.	α	$[\alpha]_D^{20}$
A	0.25	4.2	6.6
B	0.125	2.2	5.2
C	0.075	1.8	6.0
D	0.05	1.5	6.0
MUESTRA DE DEXTRANO			
1	0.01	2.4	75

índice del agua = 0.9

Tabla 4.7 Rotación Óptica de muestras de estándar de Dextrano comercial y de la muestra de Dextrano obtenido en el laboratorio.

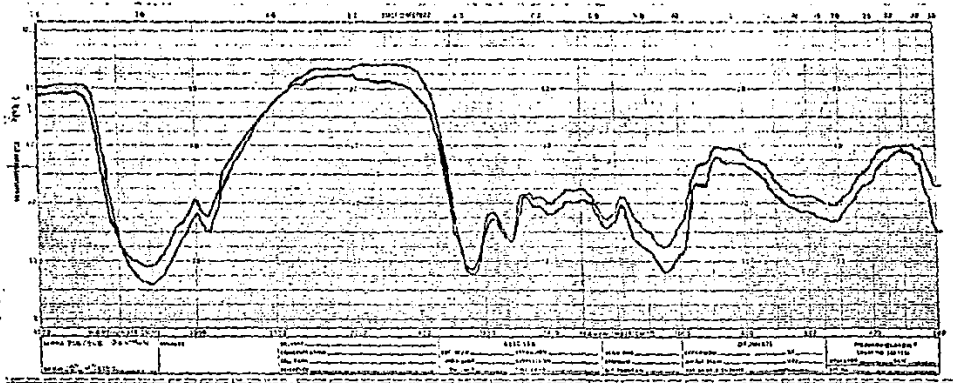


Fig. 4.4 Gráfica de infrarrojo de dos muestras de Dextrans obtenido en nuestro laboratorio.

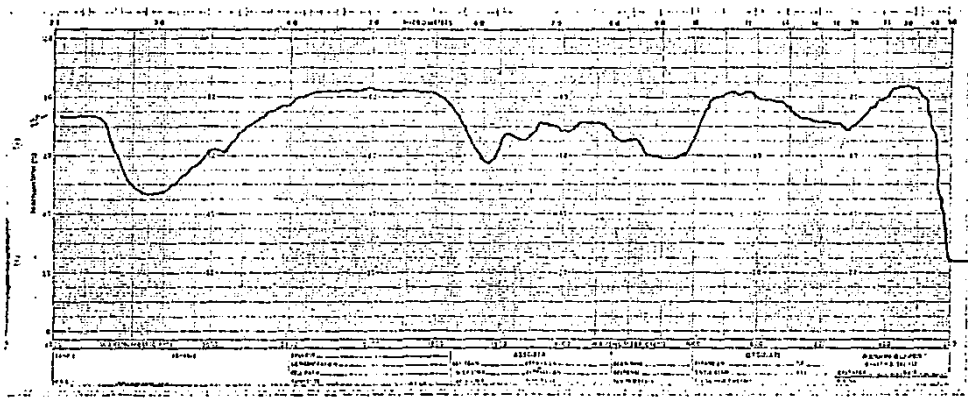


Fig. 4.5 Gráfica de infrarrojo de muestra de Dextrano obtenido en nuestro laboratorio.

4.6).- Prueba de viscosidad y Pesos Moleculares.

Se realizó la prueba a Dextrano patrón comercial y a muestra de Dextrano obtenido en el laboratorio, obteniendo las siguientes tablas y figuras:

C gr/ml.	τ_1 seg.	$\eta_{rel.} = \tau_1/\tau_0$	$\eta_{esp.} = \eta_{rel.}^{-1}$	$\eta_{esp.}/C$
0.0400	149.4	2.65	1.65	41.25
0.0363	139.8	2.46	1.46	40.22
0.0333	131.1	2.30	1.30	39.03
0.0307	124.7	2.18	1.18	38.43
0.0285	120.0	2.08	1.08	37.89
0.0200	101.0	1.74	0.74	37.00

C = Concentración
 τ_1 = tiempo del Dextrano
 τ_0 = tiempo del solvente (agua destilada)

Tabla 4.8 Relación de concentración y viscosidades del Dextrano patrón.

Viscosidad Intrínseca = 32.18

Peso Molecular = 59,690

Temperatura = 50°C.

$K = 39.3 \times 10^{-3}$

$n = 0.61$

datos de constantes tomados de bibliografía (95).

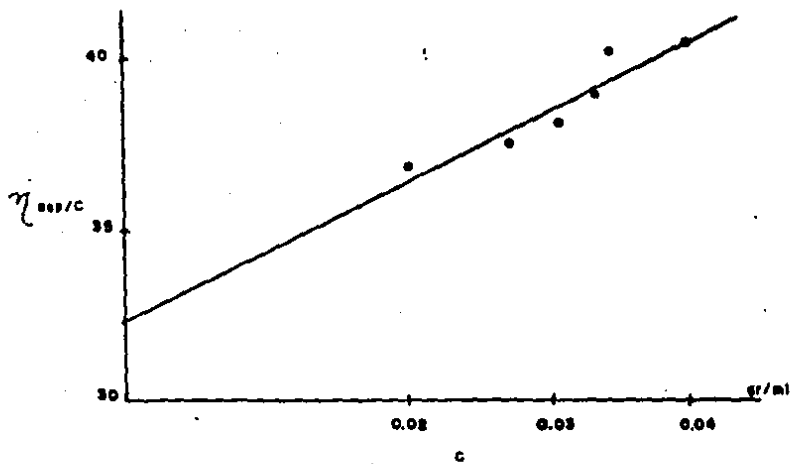


Fig. 4.5 Gráfica de viscosidad de Dextrano patrón comercial.

Viscosidad de nuestra muestra de Dextrano.

C gr/ml.	t ₁ seg.	$\eta_{rel.} = t_1/t_0$	$\eta_{esp.} = \eta_{rel.}^{-1}$	η_{esp}/C
0.0400	113.8	2.01	1.01	25.55
0.0363	107.2	1.88	0.88	24.24
0.0333	102.2	1.79	0.79	23.72
0.0307	97.2	1.69	0.69	22.47
0.0285	95.0	1.64	0.64	22.45
0.0200	82.8	1.42	0.42	21.00

C = Concentración
t₁ = tiempo del Dextrano
t₀ = tiempo del solvente (agua destilada)

Tabla 4.9 Relación de concentración y viscosidades de Dextrano muestra.

Viscosidad Intrínseca = 16.16

Peso Molecular = 18,816

Temperatura = 50°C.

K = 39.3 x 10⁻³

a = 0.61

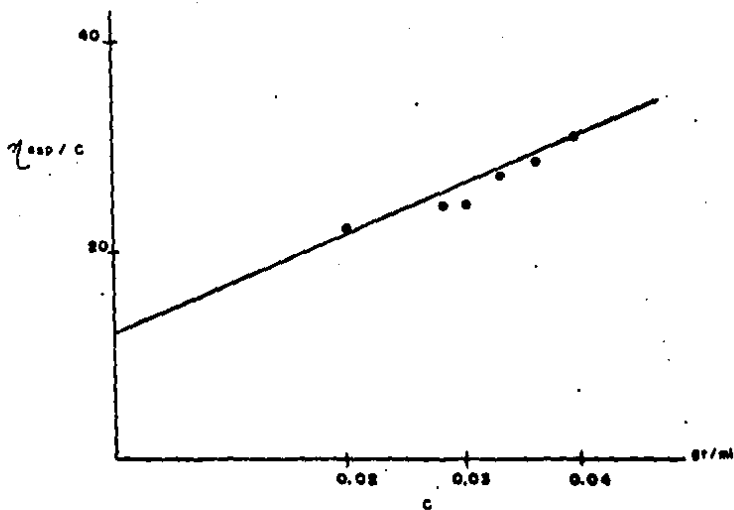


Fig. 4.6 Gráfica de viscosidad de Dextrano problema.

CAPITULO 5
ANALISIS DE RESULTADOS

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Obtención microbiológica.

Podemos concluir que de ésta parte la obtención del *Leuconostoc mesenteroides* si se puede realizar a partir de materia prima nacional usando caña de azúcar para el aislamiento de la cepa. El proceso toma tiempo para aislar la cepa adecuada, porque se utilizan técnicas de prueba y error, pero los resultados confirman que el desarrollo de la técnica utilizada, es el mejor camino para obtener este microorganismo, ya que si se llevan a cabo otras técnicas el riesgo de contaminación por hongos, levaduras y bacterias se incrementa a tal grado que no es controlable.

Pruebas de control.

Prueba de precipitación. Se puede deducir que la mayor cantidad de precipitado se obtiene alrededor de 24-36 horas, pero las pruebas requieren mucho tiempo para la precipitación y había variación del tiempo según la cepa utilizada. No se realizó cuantificación exacta del precipitado, por ser muestras de alícuotas tan pequeñas.

Prueba de Azúcar reductor. Según los datos obtenidos el tiempo óptimo para retirar la fermentación está entre las 24 y 36 horas porque aunque la fermentación continúa incrementando el valor titulable del azúcar reductor, el tiempo que ocupa el microorganismo es mucho mayor que aquel al inicio del proceso. La gráfica (Fig. 4.1) muestra la disminución de la relación entre el tiempo y los gramos de azúcar reductor titulados.

Prueba de pH. El tiempo recomendado por algunos autores para dar fin a la fermentación es aquel cuando el pH alcanza el valor de 4.2 - 4.8. La muestra "A" de nuestra prueba debía retirarse aproximadamente entre las 24 y 35 horas de iniciada la fermentación; y la muestra "B" entre las 24 y 30 horas. Concordando con lo pensado de 24 horas como menciona la bibliografía.

Prueba de Infrarrojo. Se realiza esta prueba antes de seguir con el procedimiento de purificación y comprobación fisicoquímica del Dextrano para verificar que nuestro producto aún que se encuentre con alto contenido de impurezas sea Dextrano. Si no se cumple el análisis de los picos en comparación con Dextrano patrón comercial, entonces no se sigue con el procedimiento.

Rendimiento.

Existe mucha pérdida de Dextrano en las filtraciones con tierra de diatomea, porque antes de filtrar se dejó secar la muestra y se pesó antes de redissolver en agua, aunque se deben retener impurezas, células muertas, etc.; la diferencia en pesos es muy grande.

El rendimiento mayor de 8.86% es relativamente bueno de acuerdo a la pérdida.

Prueba de absorción de Infrarrojo.

Los diagramas de infrarrojo de las muestras fueron comparados con el del patrón y se observaron mucha similitud en picos diferentes, aunque también existieron diferencias, principalmente ocasionadas por la purificación dentro del procedimiento que no es tan especializada como la del Dextrano comercial.

Prueba de rotación óptica.

Se comprobó que la rotación es hacia la derecha, con la prueba realizada al Dextrano obtenido en el laboratorio. La concentración de nuestra muestra de 0.01 grs. en 100mls. es tan baja, porque soluciones mayores eran tan turbias que no se podían realizar las mediciones.

Prueba de viscosidad para determinar Peso Molecular.

Esta prueba lleva muchos factores de error que no nos proporcionan datos muy certeros. La prueba se realizó con Dextrano comercial y con Dextrano obtenido en el laboratorio, y al determinar el Peso Molecular pudimos notar diferencia entre los Pesos.

Entre los errores tenemos: cronométrico, muestra completamente anhidra para ser pesada con valores reales de concentración, la impureza de la muestra que nos proporciona valores alterados de pesado, etc.

Este método requiere de mucha sincronización, de escrupulosas mediciones, de alto control en factores ambientales, etc., para poderse considerar como un buen método para la determinación del Peso Molecular de un compuesto.

Si nuestro laboratorio contara con equipo más especializado, se podrían realizar muchas más pruebas con excelentes rendimientos y resultados.

CAPITULO 6
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La obtención microbiológica del Dextrano se hizo utilizando una cepa aislada a partir de caña de azúcar con las siguientes características:

Temperatura de crecimiento de la cepa = 25°C
Medio de cultivo utilizado = Medio de Tarr y Hibbert.
pH = 7.0
Tiempo de incubación antes del fermentado = 24 horas.
Tiempo óptimo de fermentación = 24-36 horas.
Temperatura de fermentación = 25°C
pH final de fermentación = 4.3 - 4.6

El Dextrano obtenido en nuestro laboratorio presenta las siguientes características:

Rendimiento = 8.86%
Rotación óptica = +2.4°
Rotación específica = +75°
Viscosidad intrínseca = 16.16
Peso Molecular = 18,816

Cumplimos con nuestros objetivos planteados en este proyecto, pero queda el campo abierto para investigaciones posteriores para el mejoramiento de los métodos empleados.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE

A P E N D I C E

Formulación y preparación de medios de cultivo, pruebas bioquímicas, y soluciones para determinaciones fisicoquímicas de la obtención microbiológica de Dextrano.

MEDIO DE CULTIVO DE TARR & HIBBERT (85)

Sacarosa	10%
K_2HPO_4	0.5%
NaCl	0.5%
Peptona	0.5%
pH 6.8- 7.2	

Disolver los reactivos en agua destilada. Dejar reposar 5 min. Calentar en mechero hasta que todos los reactivos queden completamente disueltos, el color cambia a amarillo y queda el medio cristalino. Si se desea hacerlo sólido se agrega 15 - 20% de agar. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 1 hora.

AGAR HIERRO KLIGLER (95)

Peptona	20 grs.
Extracto de carne	3 grs.
Extracto de levadura	3 grs.
Lactosa	10 grs.
Dextrosa	1 gr.
Cloruro de sodio	5 grs.
Citrato férrico amónico	0.5 grs.
Tiosulfato sódico	0.5 grs.
Agar	12 - 15 grs.
Rojo de Fenol	0.025 grs.
Agua destilada	1 lt.
pH final 7.4	

Mozclar y calentar con agitación hasta que se disuelvan los componentes. Distribuir en tubos para agar inclinado y esterilizar a 121°C, 15min.

MEDIO INTOL. NITRITO (95)

Digerido pancreático de caseína	20 grs.
Fosfato disódico	2 grs.
Dextrosa	1 gr.
Agar	1 gr.
Nitrato potásico	1 gr.
Agua destilada	1 lt.
pH final	7.2

Añadir 2 grs. de agar si se utiliza para pruebas de motilidad. Calentar con agitación hasta ebullición. Distribuir en tubos llenos hasta la mitad, Esterilizar en autoclave 118 - 121°C, 15 min.

PRUEBA DE CATALASA (95)

Agua oxigenada al 30% 1 gota.

Colocar la colonia en un portaobjetos y añadir el agua oxigenada.

LICUEFACCION DE LA GELATINA (96)

Gelatina nutriente	
Extracto de res	3 grs.
Peptona	5 grs.
Gelatina	120 grs.

Añadir los ingredientes a 1 lt. de agua destilada. Caliente en un baño doble cubierto, hasta disolver por completo. Después de vertir en los recipientes, esterilice en el autoclave a 0.58 Kg/cm² de presión durante 20 min.

SACAROSA, ARABINOSA, MANITOL.

Carbohidrato	10%
Base rojo de Fenol	1.5%

Añadir a los ingrediente agua destilada. Disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

S.I.M. (97)

Peptona	30 grs.
Ext. de carne	3 grs.
Hierro peptonado DIFCO	0.2 grs.
Tiosulfato sódico	0.025 grs.
Agar	3 grs.

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C .

Resuspender 36 grs. del medio en 1 lt. de agua destilada.

Calentar a ebullición para disolver por completo. Dispense en tubos, esterilice 15 min. a 121°C y 15 lbs de p. Dejar solidificar en posición vertical.

REACTIVO DE KOVAC (96)

Para prueba de Indol.

Para dimetil amino benzaldehido	5 grs.
Alcohol amílico o butírico	75 mls.
Acido clorhídrico (37%)	25 mls.

Disuelva el para dimetil amino benzaldehido en el alcohol caliente - suavemente la solución, en un baño de agua tibia. Una vez disueltos los ingredientes, agregue el ácido clorhídrico con cuidado.

COLORACION DE GRAM (98)

Violeta de genciana

Lugol

Alcohol cetona

Safranina

Después de hacer un frotis de la colonia a observar, se fija con calor y se colorea con Violeta 1 min. lavar con agua corriente; se agrega Lugol por 1 min. y se lava nuevamente; se utilizan unas gotas de alcohol cetona para decolorar, las cuales se retiran inmediatamente con lavado y por ultimo se coloca Safranina 1 min. y se lava con agua. Secar al aire.

SOLUCIONES DE GLUCOSA O DEXTRANO PATRON COMERCIAL

Carbohidrato suficiente para hacer las soluciones con concentración conocida, añadiendo agua destilada.

SOLUCION SOXHLET (99)

La solución Soxhlet es modificación de la solución de Fehling. Preparando volúmenes iguales de a) y b) inmediatamente antes de usar:

a) Solución de Sulfato de Cu = Disolver 34.639 grs de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluir a 500 mls. Filtrar. Determinar Cu y ajustar a contener -- 440.9-mg. de Cu / 25 mls.

b) Solución alcalina de tartrato. Disolver 173 grs. de $\text{KNa tartrato} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Rochelle Sal) y 50 grs. de NaOH en agua y diluir a 500 mls., dejar reposar 2 días antes de su uso. Si la solución no es cristalina hacer filtración a travez de asbestos.

BIBLIOGRAFIA

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

- (1) Encyclopedia of polymer science & technology
Interscience Publishers, Vol. 4
New York, U.S.A., 1966, PP 805-821
- (2) Squire, Bull, Maycock, Ricketts.
Dextran its properties and use in Medicine
Blackwell Scientific Publication
England, 1955, PP 1-81
- (3) Microbial Technology
Ed. Henry J. Pepler
Reinhold Publishing Co.
U.S.A., 1967, PP 385-388
- (4) Rehn H.J. & Reed G.
Biotechnology, Vol. 3, Verlagchemie
F.R. Germany, 1983, PP 554-557
- (5) Gruber U.F.
Blood replacement
Springer Verlag
New York, U.S.A., 1969, PP 56-65, 78-81, 102-104
- (6) Brock T.D.
Biology of microorganisms
Prentice Hall Inc.
New York, U.S.A., 1974, PP 142-143
- (7) Jirgensons B.
Natural Organic Macromolecules
Pergamon Press
New York, U.S.A., 1962, P 170.

- (8) Jirgensons B.
Organic Colloids
Elsevier Publish Co.
New York, U.S.A., 1958, PP 385-387
- (9) Molecular Biology
Ed. Asinall Gerald, Vol. 12
Academic Press
New York, U.S.A., 1983, PP 346-347, 474-475
- (10) Guizard C., Chanzy H., Sarko A.
The Molecular and Crystal Structure of Dextrans:
A combined electron and X-ray diffraction study
II. A low temperature, hydrated polymorph
J. Mol. Biol. Vol. 183, June 1985, PP 397-408
- (11) Larm O., Linberg B. & Svensson S.
Studies on the length of the side chains of the Dextran elaborated
by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512
Carbohydr. Res., 20 (1971), PP 39-48
- (12) Frederick E.
Annals of the New York Academy of Sciences
Branched Molecules
Vol. 57 Art. 4 Nov 19 1953, PP 353-359
- (13) Jeanes A.
Immunochemical and related interactions with Dextrans reviewed in
terms of improved structural information
Molecular Immunology, Vol.23, No.9, 1986
Great Britain, PP 999-1028
- (14) Sanford P.A. & Baird J.
Industrial Utilization of polysaccharides
Bradford Co. U.S.A., 1977, PP 474-475

- (15) Conference Sponsored by Committee on trauma.
Evaluation of Low Molec. Weight Dextran in Shock.
Ed. Ben Eisenan & Peter Bosomworth
Washington D.C., 1963, PP 2-5
- (16) Prescott S.C. & Dum C.G.
Industrial Microbiology
3th. Ed. McGraw Hill Book Co. Inc.
New York U.S.A., 1959, PP 370-391
- (17) Thorén L.
The Dextrans - Clinical Data
Rev. Biol. Stand. 48
1980, PP 157-177
- (18) Thorén L.
Dextran as a plasma volume substitute
Blood Substitutes and Plasma expanders
Liss A.R. Inc., New York, U.S.A., 1978, PP 265-282
- (19) Segal A.
The clinical use of Dextran solutions
Grune / Stratton
New York, U.S.A., 1964, PP 52-63
- (20) 1964-1965 Drugs of choice
Walter Modell, Ed.
The C.V. Mosby Co. Saint Louis U.S.A.
1964, PP 91, 92 & 692.
- (21) Mauzac M., Jozefonvicz J.
Anticoagulant activity of Dextran derivatives.
Part I: Synthesis and characterization.
Biomaterials Vol. 5 September 1984, P 301

- (22) Bertram G. Katzung
Farmacología Básica y Clínica
El Manual Moderno S.A. de C.V.
México D, F. 1984, P 367
- (23) 1983 Drugs of choice
Walter Modell Ed.
C.V. Mosby Co. U.S.A., 1982, PP 78-79, 653-655
- (24) Bearlie J., del Río F., López Fernández M.F., Martín R. and
López Borrasca A. Effect of Dextran on Factor VIII/von Willebrand
Factor Structure and Function.
Thrombosis and Haemostasis Vo. 54., No.3, Oct. 1985, PP 698-699
- (25) Sobel M., Adelman B., Greenfield L.J.
Dextran 40 recedes heparin mediated platelet aggregation
Journal of surgical research Vol. 40, N.4, 1986, PP 382-387
- (26) Physiological Effectis of Food carbohydrates
Ed. Jeanes & Hodge A.C.S. Symposium series 15
Amer. Chem. Soc. Wash D.C., U.S.A., 1975, PP 339-341
- (27) Ikedín H., Richter W., Messmer K., Renck H., Ljungström K.G., and
Laubenthal H.
Incidence, pathomechanism and prevention of Dextran induced anaphylac
toid/ Anaphylactic reactions in man
Dev. Biol. Stand. N.48, 1980, PP 179-185
- (28) Dextran 30 years
Acta Universitatis upsaliensis
Ed. David H. Lewis
Uppsala Sweeden, 1977, PP 10-29
- (29) White A.
Principles of Biochemistry 3th Ed.
MacGraw Hill Book Co.
U.S.A., 1977, PP 41, 138, 411

- (30) Rosemeyer H., Kürnig E., Seela F.
Adenosine Deaminase covalently linked to soluble Dextran
The effect of immobilization on Thermodynamic and Kinetic Parameters
Eur. J. Biochem Vol. 122 Feb., 1982, PP 375-380
- (31) Henze E., Robinson G.D., Kuhl D.E. Schelbert H.R.
Tc-99m Dextran: A new blood pool labeling agent for radionuclide angiography. The Journal of Nuclear Medicine, Vol. 23 N. 4, 1982, P 348
- (32) Marciano D.
Tc-99m Dextran scintigraphy of lymph drainage from malignant meloma
Clin. Nucl. Med. Vol. 10., 1985, P23
- (33) Pettersson K.S.A., Vanharanta R.M. Söderholm R.M.
Pitfalls in the Dextran coated charcoal assay of estrogen receptors in breast cancer tissue.
J. Steroid. Biochem. Vol. 22., Vo. 1., 1985, PP 39-45
- (34) Achütt U., Thorén T., Sjöstrand U., Berséus O., Söderholm B.
Three per cent Dextran 60 as a plasma substitute in blood component Therapy L. An alternative in surgical blood loss replacement
Acta Anaest. Scand., ol. 29, Nov. 1985, PP 767-774
- (35) Schütt U., Thorén T., Sjöstrand U., Berséus O., Söderholm B.
Three per cent Dextran 60 as a plasma substitute in blood component Therapy LL. Comparative studies on pre and postoperative blood volume
Acta Acaest. Scand. Vol. 29., Nov. 1985, PP 775-781
- (36) Chavez Negrete A., Fruti Munari A.C., Martínez D.A., Argüero Sánchez R., Hurtado Figueroa R.
Hemodilución de gran volumen en la eritrocitosis secundaria
Rev. Med. I.M.S.S. No. 25, México 1987, PP 47-51
- (37) Navaratnarajah M., Davenport H.T.
The prolongation of local anaesthetic action with Dextran.
Anaesthesia N. 40, 1985, PP 259-262

- (38) Hassan H.G., Renck H., Kindberg B., Askerman B., Hellquist R.
Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration.
I. Studies of Dextran of widely varying molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block.
Acta Anaesth Scand. N. 29, 1985, PP 375-379
- (39) Kindberg H., Svennevig J.L., Vathe K., Lilleassen P., Abdelnor M.
Early postoperative changes with different priming solutions in open heart surgery
Scand J. Thorac Cardiovasc Surg., N. 19, 1985, PP 39-44
- (40) Edwards W.H., Edwards W.H. Jr., Mulherin J.L., Jenkins J.M.
The role of Dextran in severe ischemic extremity disease and arterial reconstructive surgery
Ann Surg. N. 201, 1985, PP 765- 770
- (41) Bergvist D. and Bergents S.E.
The role of antiplatelet drugs in carotid reconstructive surgery
VASA, Vol. 12 No. 3, 1983, PP 213- 218
- (42) Polack P.J., Polack F.M.
The effects of a new intraocular irrigating solution containing Dextran on rabbit corneal endothelium
Cornea N. 4, 1986, PP 210- 219
- (43) Pels E., Schward Y
The effects of High Molecular weight Dextran on the preservation of human corneas
Cornea Vol.3, No. 3, 1984, PP 219-227
- (44) Erlach A., Rinke E.
Treatment of inner ear hearing loss with low molecular Dextran
Niedermolekulare Dextrane (Rheomacrodex) in der Therapie der Innenohrschwerhörigkeit.
Wien Med Wochenschr, N. 136, 1986, PP 473- 476

- (45) Creutzif A., Alexander K.
Drug induced alteration in muscle tissue oxygen pressure in patients with arterial occlusive disease.
Int. Microcir. Cll. Exp N. 4, 1985, PP 173-181
- (46) Konopada W
Die Hæmodilution beim Kaiserschnitteingriff/ Hemodilution in caesarean section.
Zentralbl Gynaekol , No. 106, 1984, PP 660-665
- (47) Chevraud C., Voisin P., Burdin D., Guimont C., Laxenaire M.C., Stoltz J.F.
Deliberate normovolemic hemodilution during the medial treatment of arteriopathy of the lower limbs: rheological effects
Clin. Hemorheology N. 5, 1985, P 722
- (48) Stoltz J.F., Chevraud C., Voisin P., Burdin D., Streiff F., Lawenaire M.C. Association albumine diluée-Dextran 40 dans le traitement de l'artériopathie des membres inférieurs par hémodilution normovolémique.
J. Mal Vasc N. 11 1986, PP 344-350
- (49) Messmer K.
Acceptable hematocrit levels in surgical patients
World J. Surg. No. 11, 1987, PP 41-46
- (50) Litwin M.S.
Blood viscosity changes after trauma
Critical Care Medicine Vol. 4 No. 2, 1976, PP 67-69
- (51) Modig J. Síndrome de Insuficiencia respiratoria del adulto
Acta Chir Scand N. 152, 1986, PP 241-249
- (52) Modig J. Advantages of Dextran 70 over ringer acetate solution in shock treatment and in prevention of adult respiratory distress syndrome.
Resuscitation, N. 10, 1983, PP 219-226

- (53) Gruber U.F., Ridrich R., Duckert F., Torhorst J., Rem J.,
Prevention of postoperative thromboembolism by Dextran 40
The Lancet, January 29, 1977, PP 207-210
- (54) Gruber U.F., Saldcen T., Brokop T., Eklof B., Eriksson I., Golden I.
Incidences of fatal postoperative pulmonary embolism agter prophylaxis with Dextran 70 and low dose heparin: an international multicentre study., British Medical J. N. 10, 1980, PP 69-77
- (55) Ljungström K.G.
Dextran prophylaxis of Fatal Pulmonary embolism
World Journal of Surgery N. 7, 1983, PP 767-772
- (56) Atik M.n Brochamer W.L.
The impact of prophylactic measures on fatal pulmonary embolism
Arch Surg. Vol. 114 1979, PP 366-368
- (57) Fujii H.
Plasmapheresis with a single use of Dextran 40 in primaty macroglobulinemia. Acta Haematol Ja., N. 48, 1985, PP 1214-1220
- (58) Nadrowski L.F.
Pathophysiology and current treatment of Intestinal Obstruction
Review of Surgery Vol. 31, N. 6, Nov/Dec 1974, PP 381-407
- (59) Matthews R.N.
An evaluation of Dextranomer granules as a new method of treatment of alveolar osteites. Br. Dent. J., March 1982, PP 157-163
- (60) Foulks G.N.
Treatment of recurrent corneal erosion and corneal edema with tropical osmotic colloidal solution
American Academy of Ophthalmology, Vol. 88, N.8, 1981, PP 801-803
- (61) Becker H., Senninger N.
Haemorrhagische Pankreatitis: Effekt von Dextran 40 und Plasma auf die Microzirkulationsstoerung des Pankreas.
Langenbecks arch. Chir. N. 365, 1985, PP 57-67

- (62) Klar E., Messmer K.
Improvement of pancreatic microcirculation during acute pancreatitis
by isovolemic hemodilution with Dextran 60
Digestion N. 32., 1985, P 194
- (63) Gross D.R., Dodd K.T., Weck D.W., Fife W.P.
Hemodynamic effects of 10% dextrose and of Dextran 70 on hemorrhagic
shock during exposure to hyperbaric air and hyperbaric hyperoxia
Aviat Space Environ Med. N. 55, 1984, PP 1118-1128
- (64) Haljamace H.
Rationale for the use of colloids in the treatment of shock and hypo-
volemia. Acta Anaest. Scand. N. 29, 1985, PP 48-54
- (65) Kramer G.C., Gunther R.A., Perron P.R., Ho H., Kindsay D.C.
Small volume resuscitation of hemorrhagic hypovolemia using hypertonic
saline/Dextran.
J. Traumat. N. 25, 1985, PP 696-698
- (66) Brassai Z., Kovalszki P., Pop G.H., Kiss K., Olosz E.
Hypervolemic treatment of the chronic obliterative arteriopathies
of extremities. Mes Interne N. 24, 1986, PP 37-41
- (67) Miller C.L., Kim R.C.
Dextran as a modulator of immune and coagulation activities
Surg. Res. N. 39, 1985, PP 183-191
- (68) Matsuda H., Shoemaker W.C.
Cardiorespiratory Responses to Dextran 40
Arch Surg. Vol. 110 March 1975, PP 296-300
- (69) Isbister J.P.
Strategies for avoiding or minimizing homologous blood transfusion:
a sequel to the AIDS scare
Med. J. Aust. N. 142, 1985, PP 596-599

- (70) Keller T.S., McGillicuddy J.E., Libond V.A., Kindt G.W.
Modification of focal cerebral ischemia by cardiac output augmentation
J. Surg. Res. N. 39, 1985, PP 420-432
- (71) Rutherford R.B., Jones D.N., Bergentz S.H., Bergqvist D., Karmody A.
M., Dardik H., Moore W.S., Goldstone J., Flinn W.R.
The efficacy of Dextran 40 in preventing early postoperative thrombosis
following difficult lower extremity bypass
Journal of vascular surgery, Vol 1 No.6, 1984, PP 765-773
- (72) Bergqvist D
Prevention of postoperative thromboembolism in Sweden
Thromb Haemostas 53, 1985 PP 239-341
- (73) Lao T.T., de Swit N., Letsky E., Walters B.N.J.
Prophylaxis of thromboembolism in pregnancy: an alternative
Br. J. Obstet Gynecol No. 92, 1985, PP 202-206
- (74) Reileras O., Nordstrand K.
Use of Dextran to prevent intraperitoneal adhesions caused by maize
starch powder. Eur Surg. Res. N. 17, 1985, PP 251-253
- (75) Tulandi T., Hilton J.
Effect of intraperitoneal 3% Dextran 70 on blood coagulation and
serum electrolytes. J. Reprod Med., N. 30, 1985, PP 431-434
- (76) Bostrom S., Holmgren E., Jacobson L., Jacobson L., Jonsson O.,
Lindstrom B., Winsoe I., Zachrisson B.
Prophylaxis of postoperative thromboembolism in neurosurgery
Acta Neurochir No. 78, 1985, P 69
- (77) Green S., Szabo R., Langa V., Klein M.
The inhibition of flexor tendon adhesions
Bull Hosp Joint Dis Orthop Inst. No. 46, 1986, PP 16-21
- (78) Reileras O., Nordstrand K., Soerlie D.
Use of Dextran to prevent pericardial adhesions caused by maize
starch powder. Eur. Surg. Res. No. 19, 1987, PP 62-64

- (79) Vara-Thorbeck R., Rosell-Pradas J.
Prophylaxe der tiefen Venenthrombose
Zentralbl Chir N. 111, 1986, PP 633-639
- (80) Rieger H., Köhler M., Schoop W., Schmid-Schönbein H., Roth F.J.
Hemodilution (HD) in patients with ischemic skin ulcers
Klinische Wochenschrift N. 57, 1979, PP 1153-1161
- (81) Nasar M.A., Morley R.
Cost effectiveness in treating deep pressure sores and ulcers
Practitioner. Vol. 226 February 1982, PP 307-308
- (82) Bixler G.H.
Dextran. Industrial and Engineering Chemistry Vol. 45 No. 4, 1953
PP 692-705
- (83) Petov I.R. Filatov A. N.
Plasma substituting solutions
National Library of Medicine U.S. Public Health service
Wash. D.C. U.S.A., 1964, PP 67-71
- (84) Nilsson K.
Measurement and control of quality determining properties of clinical
Dextrans. Dev. Biol. Stand No. 48, 1980, PP 169-177
- (85) Tarr H.L.A. & Hibbert H.
Dextran wrouth
Can. J. res., Vol. 5, 1931, P 414
- (86) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
7th ed. The Williams & Wilkins Co.
Baltimore U.S.A., 1957, reprint 1972, PP 531-532
- (87) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
8th ed. The Williams / Willins Co.
Baltimore U.S.A., 1974, PP 510-513

- (88) Jergensen A.
Microorganisms and fermentation by the lab.
6th ed. Cera Ed.
U.S.A., 1939, PP 268-269
- (89) Collins C.H., Lyne P.M.
Microbiological Methods
Butterworths. London England, 1984, PP 340-341
- (90) Demain A.L., Solomon N.A.
Biology of Industrial Microorganisms
Bioyhechnolohy series. The Benjamin/Cummings Pub Co.
Canada, 1985, PP 144, 145, 178, 179.
- (91) Fessenden R.J., Fessenden J.S.
Química Orgánica
Iberoamericana
México D, F. 1982, PP 816-829
- (92) Skoog D.A., West D. M.
Análisis instrumental
2a. ed. Interamericana
México D, F., 1984, PP 221, 385-387
- (93) Maron H.S., Prutton C.F.
Fundamentos de Fisicoquímica
Limusa, México, 1982, PP 66, 68, 876
- (94) Brandrup J.
Polyjer Handbook, Ed. J. Brandrup
2 ed. New York, U.S.A. 1975
- (95) Lennette E.H.
Anual de microbiología clínica
Salvat, Barcelona, España, 1981, PP 916, 933, 945

- (96) Bradshaw J.
Microbiología de laboratorio
El manual moderno
México D, F., 1924, P 224
- (97) Manual DIFCO
Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología
10 ed., Gráficas Letras
Madrid España, 1984, P 761
- (98) Carpenter P.L.
Microbiología
Interamericana
México D, F., 1982, P 56
- (99) Methods of Analysis of the Association of Official Analytical
Chemists. 13th ed.
Wash. D.C., U.S.A., 1980, P 513