

Nº 51
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“CREACION DE UN BANCO DE REACTIVOS
PARA LAS ESCUELAS DE QUIMICA”

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

CARLOS GARCIA MORENO



México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

CAPITULO I

Introducción 1

Lista de reactivos 3

CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL

Contrainmunolectroforesis 6

Inmunolectroforesis 12

Purificación de Acs por precipitación
con etanol 20

CAPITULO III

Resultados de la Parte Experimental 24

CAPITULO IV

Resumen y conclusiones 29

CAPITULO V

Bibliografía 31

APENDICE

Reactivos Organicos 35

Reactivos Biológicos 50

Reactivos Clinicos 74

CAPITULO I

INTRODUCCION

Debido a la crisis económica que ha venido sufriendo el país desde los primeros años de la década de los 80^s el Gobierno Federal redujo los subsidios en muchos aspectos de la vida económica y las universidades no fueron la excepción y si se toma en cuenta que en las universidades públicas la mayor parte de su presupuesto es cubierto por el Gobierno y los recursos propios son mínimos, la búsqueda de nuevas alternativas de orden económico se convirtió en factor de vital importancia, así como la optimización del empleo de los recursos ya existentes.

Una de esas posibilidades a explorar para resolver el problema de la adquisición de reactivos, es el programa del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C. (CNGFEM), consistente en estructurar un banco de datos sobre las técnicas para la obtención, purificación y reciclaje de reactivos que han sido desarrollados en las universidades. La selección de estos reactivos se basó en:

- Alto costo.
- Adquisición difícil, por ser de importación.
- De fácil preparación, lo que abate su costo y facilita su disponibilidad.

La creación de este banco de reactivos se hizo en cuatro etapas:

La primer etapa de este programa denominado CREACION DE UN

BANCO DE DATOS SOBRE REACTIVOS PARA LAS ESCUELAS DE QUIMICA, fue la de reunir la información sobre el tema con que contaban los profesores de la Sección de Química Experimental, de las áreas de Análisis Clínicos y de Inmunología de la Facultad de Química, UNAM.

La segunda etapa fue la consulta de diferentes fuentes de información escrita, tales como manuales de prácticas, textos de química orgánica, etc.

La tercer etapa fue la creación del banco de datos con toda esta información.

El banco de datos sobre reactivos cubre básicamente tres aspectos:

Síntesis.

Purificación.

Preparación.

Para que el manejo del banco fuera rápido y sencillo, a cada grupo de reactivos se le asignó una clave: RO para los orgánicos, RB para los biológicos y RC para los clínicos. Hasta ahora este banco de datos comprende 17 reactivos orgánicos sintetizados a partir de materias primas simples o de grado técnico, un reactivo purificado a partir de un producto comercial, tres productos para pruebas clínicas y 13 reactivos biológicos (incluido uno nuevo, descrito en la parte experimental). La información sobre cada reactivo incluye el empleo que se le da en el laboratorio.

Listado de reactivos

Orgánicos

- RO-001 Acetanilida
- RO-002 Acetato cúprico
- RO-003 Acido picrico
- RO-004 Acido sulfanilico
- RO-005 Anilina
- RO-006 Acetofenona
- RO-007 Benzilo
- RO-008 M-dinitrobenceno
- RO-009 Acetato de sodio
- RO-0010 P-nitroanilina
- RO-0011 N,N-dimetilanilina
- RO-0012 Cloruro de benzilo
- RO-0013 Clorobenceno
- RO-0014 P-diclorobenceno
- RO-0015 Benzaldehido
- RO-0016 O-fenilendiamina
- RO-0017 Benzoina
- RO-0018 Benzofenona

Biológicos

- RB-001 Anticuerpos purificados
 - Precipitación con sulfato de amonio
 - Precipitación con etanol (*)
 - Separación con DEAE-celulosa
- RB-002 Antígeno flagelar (H) de *S.typhi*

- RB-003 Antígeno somático (O) de *S. typhi*
- RB-004 Antígenos totales de *S. paratyphi A*
- RB-005 Antígenos totales de *S. paratyphi B*
- RB-006 Antígenos totales de *B. abortus*

- RB-007 Hemolisina anticarnero
- RB-008 Suero antihumano
- RB-009 Suero antibovino
- RB-0010 Suero antiporcino
- RB-0011 Suero antipollo
- RB-0012 Suero antiequino
- RB-0013 Amortiguadores para electroforesis (*)

(*) El producto obtenido en la precipitación con etanol se utilizó en Inmunolectroforesis para comprobar la pureza del reactivo.

Clinicos

- RC-001 Trombina humana
- RC-002 Tromboplastina
- RC-003 Cefalina

Elaboración del archivo:

Para elaborar este archivo en primer término se procedió a dar una redacción uniforme a la mayoría de las técnicas para la obtención de los reactivos orgánicos, pues no en todos los casos tenían un registro escrito sino que se conservaban en libretas o en tarjeteros de uso interno con diferente redacción. Para los reactivos biológicos y los clínicos se contaba ya con la fuente escrita pero hubo necesidad de

modificarla para que la descripción del método fuera resumida. Una vez ordenada esta información se cargó en un archivo Wordstar. La realización de la parte experimental que comprendió esta tesis fue el desarrollo de una técnica simplificada para la purificación de anticuerpos y la sustitución de la solución reguladora de acetato-veronal por otra más accesible, para su empleo en las técnicas de inmunoelectroforesis y contraelectroforesis. El primer paso fue hacer una revisión bibliográfica para decidir cuales reactivos serían adecuados para sustituir a los reactivos convencionales y prepararlos.

La primer técnica que se montó fue la contraelectroforesis (CIEF) comparando los reactivos con los que se utilizaron en la parte experimental del curso de Inmunología. La segunda técnica que se probó fue la inmunoelectroforesis (IEF) en las mismas condiciones. Además en esta parte experimental se probó un método de purificación de los Acs con etanol reportado en la literatura¹ que simplifica al que está descrito en los manuales de laboratorio de Inmunología^{7,8}.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)

Debido a la reglamentación de la Secretaría de Salud las sustancias psicotrópicas que crean dependencia son de manejo controlado, tal es el caso de los barbitúricos que se utilizan en la preparación de las soluciones reguladoras que se emplean en las técnicas de inmunolectroforesis y contrainmunolectroforesis, por lo anterior el laboratorio o la institución educativa deberá establecer un sistema de control y contar con un Responsable Sanitario autorizado por la Secretaría, que debe llevar un registro minucioso del empleo de estos compuestos.

Por no existir Responsable Sanitario en muchos de los laboratorios que emplean estas técnicas, algunas casas comerciales distribuyen las mezclas ya listas para preparar las soluciones reguladoras, pero su costo es elevado. Debido a lo anterior se decidió substituir estas soluciones reguladoras por otras de formulación más accesible en cuanto a sus componentes y costo y que no presentaran los inconvenientes de las soluciones reguladoras que contienen en su formulación el barbiturato de sodio o el ácido 5,5-dietilbarbitúrico. Como opción se probó la solución reguladora con boratos (FNEUM 5a Edición pg 1540) $\mu=0.75$ y PH 8.6.

Fórmula de la solución reguladora de veronal-acetato ($\mu=1.13$ pH 8.6) (7) a substituir:

Solución concentrada:

Barbital sódico (C ₈ H ₁₁ N ₂ NaO ₃)	16	88.26 g
Acetato de sodio (CH ₃ COONa)	3	58.26 g
Solución de timerosal al 10%	3	3.00 ml
Agua (H ₂ O)	2	cbp 3,000.00 ml

Solución diluida:

Mezclar 800 ml de la solución de barbital-acetato con 960 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.6 con solución 0.1 N de HCl.

Fórmula de la solución reguladora con boratos a probar ($\mu=0.75$ pH 8.6)

Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	3	0.62 g
Borax (Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O)	2	0.95 g
Cloruro de sodio (NaCl)		0.44 g
Agua (H ₂ O)	2	cbp 100 ml

Fundamento:

En este método se provoca el efecto electroendosmótico (1) empleando soluciones reguladoras de distinta concentración iónica en las cámaras del aparato de electroforesis y en el gel de agar en el que se lleva a cabo la interacción por su diferencia de cargas eléctricas. Debido al efecto electroendosmótico el agua del amortiguador se carga

positivamente y migra hacia el cátodo arrastrando a los Acs cuya carga neta es practicamente cero. El Ag que tiene predominio de cargas negativas, migra hacia el ánodo y al entrar en contacto con el Ac se forman líneas de inmunoprecipitado. Por esto la única limitación para aplicar el método es que el Ag debe tener una carga negativa en este sistema de amortiguadores para que pueda migrar del ánodo al cátodo (13,14,19,20,21,34).

MATERIAL NECESARIO:

Método convencional

- Gel de agar Noble al 1.5 % disuelto en solución reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=0.01$ adicionado de 0.01% de timerosal como conservador, repartido en tubos con 2.5 ml cada uno.
- Solución reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=0.05$. 2000 ml

Reactivos comparados:

- Gel de agar Noble al 1.5 % disuelto en solución reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.01$ adicionado del 0.01 % de timerosal como conservador repartido en tubos con 2.5 ml cada uno.
- Solución reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.05$. 2000 ml.

Material comun a ambas técnicas:

- Suero problema 6 μ l⁺
 - Suero antiéquino 18 μ l
 - Suero equino (control positivo) diluido 1:10, 6 μ l⁺
 - Suero humano (control negativo), 6 μ l⁺
 - Portaobjetos 2.5 x 7.5 cm
 - Nivel de gota
 - Tripié con tela de alambre
 - Vaso de precipitado de 250 ml
 - Mechero
 - Horador de 3 mm de diámetro
 - Tiras de papel filtro Watman No.1,
de 2.5 x 10 cm
 - Aplicadores de madera
 - Hisopos
 - Tubos capilares
 - Aparato de electroforesis
- ⁺ Por cada prueba hecha por duplicado.

Técnicas:

1. Fundir el gel de agar en un baño de agua hirviendo.
2. Barnizar los portaobjetos, limpios y desengrasados, con gel de agar fundido y colocarlos en una superficie perfectamente nivelada.
3. Vaciar el gel de agar fundido sobre los portaobjetos, de la periferia hacia el centro de manera que quede una capa uniforme. Dejar solidificar el gel colocando los portaobjetos

unos minutos en el refrigerador, dentro de una caja de plástico con atmósfera húmeda, hacer una marca en el ángulo superior derecho para ubicar la numeración de los pozos.

4. Utilizando el horador practicar cortes circulares según el esquema y mediante succión o con un palillo de madera con la punta rota sacar los cilindros de agar de los cortes.

5. Mediante un capilar llenar los pozos 1, 3 y 5 con suero antiequino procurando que los pozos queden llenos, pero sin derramar su contenido.

6. Con capilares diferentes llenar el pozo No. 2 con suero equino (control positivo), el pozo No. 4 con el suero humano (control negativo) y el pozo No. 6 con el suero o plasma problema procurando que los pozos queden llenos, pero sin derramar su contenido.

7. Colocar la placa sobre el puente del aparato de electroforesis de manera que el pozo 1 quede en el ánodo y establecer contacto con el amortiguador colocando las tiras de papel Watman sobre la placa, a unos 0.5 cm del borde, el otro extremo de la tira debe quedar perfectamente sumergido en el amortiguador de la cámara. Verificar que no haya burbujas de aire entre la placa y el papel filtro.

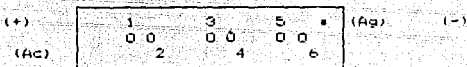
8. Dejar correr la reacción durante 60 min a 25 V por placa.

INIERPRETACION:

Desconectar el aparato, sacar las placas y observar la formación de una banda de inmunoprecipitado en el suero control positivo, si el suero problema contiene el Ag contra

el suero antiéquino se verá también una banda de inmunoprecipitado. en el suero control negativo no deberá formarse banda. La observación se facilita si se emplea iluminación tangencial sobre un fondo obscuro.

ESQUEMA:



Resultados:

De las observaciones hechas de las placas en ambos sistemas: gel de agar Noble -solución reguladora de veronal acetato y gel de agar Noble-solución reguladora de boratos se obtuvo la siguiente información: la intensidad, situación y número de bandas fue idéntica con ambas soluciones reguladoras. Este ejercicio está diseñado para investigar el antígeno de superficie Asociado a la Hepatitis "B" (Ags HB), pero se trabajó con el sistema suero equino-suero antiéquino para economizar reactivos ya que los primeros son muy caros y se comportan en forma idéntica en esta técnica.

INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

Fundamento:

En este método se caracteriza a las proteínas tanto por sus propiedades electroforéticas como antigénicas y se fundamenta en dos fenómenos, primero las proteínas se separan por electroforesis de acuerdo a su carga eléctrica y subsecuentemente se difunden en el seno de un gel frente a sus Acs. con lo que resulta la formación de líneas de precipitación individuales para cada sistema Ag-Ac (1,13,14).

En el Plasma humano y de los animales de laboratorio se pueden estudiar por medio de la IEF aproximadamente 20 proteínas, algunas de ellas se encuentran en cantidades pequeñas. (8,14,15)

La IEF se usa básicamente como método cualitativo, pero puede ser semicuantitativo si se corre paralelamente con un suero estándar y se comparan visualmente los resultados, o bien cuantitativo, si en estas mismas condiciones se lee en un integrador empleando Acs monovalentes.

Para tener un grado de resolución mayor de las líneas de precipitado es muy recomendable teñirlas con cualquier colorante para proteínas.

En el diagnóstico clínico este método tiene muchas aplicaciones: detectar las disproteinemias, la presencia de proteínas anormales, etc. El método se puede llevar a cabo también en los demás fluidos del organismo, por ejemplo L.C.R. orina, jugo duodenal, etc y en el caso de productos biológicos

se utiliza para conocer la pureza de sueros hiperinmunes tanto homólogos, como heterólogos. (1,20)

MATERIAL NECESARIO:

- Sol.reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=0.05$, 2000 ml
- Gel de Agar noble al 1.5 % disuelto en sol. reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=0.05$, adicionado del 0.01 % de timerosal como conservador, repartido en tubos con 2.5 ml cada uno.

Solucion colorante de negro de amido:

Amido black 10B .1 g
Acetato de sodio, 4.1 g
Acido acético, 30 ml
Agua cbp 1000 ml

Solucion de lavado

Acido acético, 50 ml
Glicerina, 5 ml
Agua cbp 1000 ml

Reactivos comparados:

- Sol.reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.05$, 2000 ml.
- Gel de agar Noble al 1.5 % disuelto en sol. reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.05$, adicionado del 0.01 % de timerosal como conservador, repartido en tubos con 2.5 ml cada uno.

Material común a ambas técnicas:

- Plasma humano purificado 6 μ l*
- Plasma humano crudo 6 μ l*
- Suero anti-humano polivalente 150 μ l*
- Sol.acuosa de azul de bromofenol al 0.05 %
- Sol.colorante de negro de amido 10 ml
- Sol.de lavado 80 ml
- Sol.salina isotónica 400 ml
- Vasos de precipitado de 125-250 ml
- Capilares
- Tiras de papel filtro Watman No.1 de 2.5 x 10 cm.4
- Portaobjetos, 2
- Navaja Cutter
- Horador de 3.0 mm de diámetro
- Nivel de gota
- Aplicador con capilares desechables o microjeringa de 3 μ l.
- Caja de plástico con tapa de aprox.

15 x 20 x 10 cm.

- Hisopos
- Mechero
- Tripie con tela de alambre
- Aparato de electroforesis
- Agitador magnetico

* Por cada prueba hecha por duplicado.

TECNICA:

1a. Parte: Corrimiento electroforético de los sueros.

1. Fundir el gel de agar en un baño de agua hirviente.
2. Barnizar los portaobjetos, limpios y desengrasados con gel de agar fundido y colocarlos en una superficie perfectamente nivelada.
3. Vaciar el gel de agar fundido sobre los portaobjetos, de la periferia hacia el centro de manera que quede una capa uniforme. Dejar solidificar el gel colocando los portaobjetos unos minutos en el refrigerador, dentro de una caja de plástico con atmósfera húmeda, hacer una marca en el ángulo superior derecho para ubicar la orientación de los pozos.
4. Utilizando el horador practicar cortes circulares y con la navaja cutter hacer un corte central en forma de canal guiándose por la plantilla y mediante succión o con un palillo de madera con la punta rota sacar los cilindros de agar de los cortes circulares. El gel del canal NO DEBE ELIMINARSE EN ESTE PASO.
5. Mediante un aplicador con capilares desechables o una

micropipeta proceder a colocar un volumen de 3 μ l de plasma crudo en un pozo y en el otro 3 μ l de plasma purificado procurando que los pozos queden llenos pero sin derramar su contenido. Para cada suero deberá usarse un capilar diferente y si se emplea la micropipeta se cambiará la punta desechable.

6. Adicionar 1 μ l de azul de bromofenol al pozo en que se colocó el plasma crudo, este colorante al ligarse con la albúmina sérica se irá desplazando con ésta y así se puede tener control sobre la migración de esta proteína y por consiguiente sobre la separación de todas las demás.

7. Colocar la placa sobre el puente del aparato de electroforesis de manera que los pozos queden orientados hacia el cátodo y establecer contacto con el amortiguador colocando las tiras de papel Watman sobre la placa, a unos 0.5 cm del borde, el otro extremo de la tira debe quedar perfectamente sumergido en el amortiguador de la cámara. Verificar que no haya burbujas de aire entre la placa y el papel filtro.

8. Ajustar la intensidad de corriente a 9 V por cm. La duración del corrimiento se controla observando como migra el colorante. Se considera que hay una buena separación de las proteínas cuando la distancia recorrida por la albúmina ligada al colorante es de 18 a 20 mm a partir del pozo donde se colocó el plasma crudo. Generalmente esto se logra en un máximo de 90 minutos al cabo de los cuales se desconecta el aparato.

2a. Parte: Precipitación con los anticuerpos

1. Sacar la placa de la cámara de electroforesis y con sumo cuidado para no afectar los bordes, retirar el gel del canal y llenarlo con un capilar desechable con aproximadamente 75 μ l de suero anti-humano polivalente.

2. Dejar que el suero inmune se difunda para evitar que al mover la placa se derrame del canal y volver a colocar la placa en la cámara de electroforesis, esto se hace únicamente con el objeto de mantenerla en atmósfera húmeda, ya que debe ESTAR DESCONECTADA, taponar la cámara y dejar de 18 a 20 h para que se lleve a cabo la inmunoprecipitación. También se pueden dejar en una caja de plástico hermética en la que se coloca un papel filtro impregnado con agua.

3a. Parte: Tinción de las líneas de precipitado

Aun cuando las líneas de precipitado son apreciables a simple vista observándolas sobre un fondo oscuro y con iluminación tangencial, para su mejor evaluación, especialmente si se trata de proteínas que están sólo en cantidades pequeñas, es conveniente teñirlas con cualquier colorante para proteínas.

1. Colocar la placa en una caja de plástico y cubrirla perfectamente con ssi durante 1 a 2 días, cambiando la solución varias veces al día. Este proceso se puede acelerar a sólo unas cuantas horas si se emplea agitación mecánica, cambiando también con frecuencia la ssi. Este lavado tiene por objeto eliminar las proteínas que no reaccionaron.

Lavar la placa con agua destilada para eliminar la ssi y dejarla escurrir perfectamente.

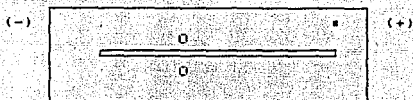
3. Colocar la placa en la caja de plástico y cubrirla con la solución colorante de negro de amido.

4. Escurrir el colorante y eliminar el exceso del colorante con solución de lavado, cambiando la solución cada 10 minutos, hasta que el gel de agar quede incoloro y solamente las bandas de precipitación teñidas.

INTERPREIACION

Al interaccionar el suero anti-humano polivalente con el plasma crudo se formara una serie de bandas, cada una corresponde a una proteína diferente siendo la de mayor movilidad la albumina. Si el producto procesado efectivamente está purificado se formarán unicamente 3 bandas de inmunoprecipitado correspondientes a las Igs principales. Si unicamente hay IgG, se formara una sola banda.

ESQUEMA DE LA PLANILLA



Resultados:

Con los reactivos convencionales y con los que se comparó,

las bandas de inmunoprecipitado fueron sensiblemente iguales en número, posición e intensidad. Lo que demuestra que la solución reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.75$ se comporta en forma idéntica a la solución reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=1.13$, llevándola a $\mu=0.05$.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR PRECIPITACION CON ETANOL .

Los procesos de purificación tienen la finalidad de eliminar todas las proteínas plasmáticas que no son anticuerpos en especial la albúmina que es la de mayor concentración. Los métodos de purificación que se emplean a escala industrial son la precipitación fraccionada con etanol y la precipitación mediante la adición de sulfato de amonio combinada con la digestión péptica. (1,7,19,20,21,34)

Tratándose de los sueros homologos el método de elección es la precipitación con etanol, método de Cohn, ya que el rendimiento es alto y además se obtienen subproductos de aplicación terapéutica y reactivos para pruebas inmunoquímicas. Estos anticuerpos purificados se pueden marcar con fluoresceína, radioisótopos o con enzimas. Los anticuerpos marcados tienen un gran número de aplicaciones en el diagnóstico de infecciones por bacterias, virus y parásitos, así como en la cuantificación de moléculas normales del organismo y en la investigación de moléculas anormales. (20,21,26)

Fundamento:

La solubilidad de una proteína varía con el pH, temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio. El etanol por tener una constante dieléctrica mas baja que la del agua, al ser adicionado a la solución de proteínas, baja la constante dieléctrica del medio, lo que incrementa la atracción entre las cargas opuestas, baja el grado de

hidratación de los grupos iónicos de las proteínas.cesa la repulsión de las cargas análogas y las moléculas tienden a coalescer y precipitan. (13,14,15,19,34)

MATERIAL NECESARIO:

- Plasma humano. 50 ml
- Etanol al 50 %. 60 ml
- Cloruro de sodio 0.15 mol/l, 100 ml
- Cloruro de sodio 0.02 mol/l,100 ml
- Fosfato disódico 0.1 mol/l, 100 ml
- Fosfato disódico 0.5 mol/l. 100 ml
- Acido acético 0.05 mol/l, 100 ml
- Probeta graduada de 100 ml,1
- Vasos de precipitado de 250 ml,2
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml,1
- Termómetro de -10 a 100 °C,1
- Pipeta graduada de 5 ml,1
- Agitador magnético
- Magneto
- Potenciometro
- Embudo de separación de 50 ml,1
- Pipeta capilar,1
- Centrifuga refrigerada

Técnicas:

Todo el proceso se lleva a cabo con reactivos y recipientes rodeados con hielo y sal gruesa para alcanzar la temperatura que se indica.El etanol se adiciona gota a gota desde un

embudo de separación que tiene adaptado una pipeta capilar para que el tamaño de las gotas sea pequeño y las mezclas se hacen con agitación magnética.

1. Colocar 20 ml de suero y 40 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, agitar, y colocarlo en un baño de hielo y sal gruesa a 0 °C, ajustar a pH 7.7 con fosfato disódico 0.5 M.

2. Añadir gota a gota con agitación continua 24 ml de etanol al 50 % enfriado a -20 °C. Durante la adición del etanol la temperatura debe mantenerse a -5 °C en un baño de hielo y sal.

3. Centrifugar a 16650 G durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada a -5 °C.

4. Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 60 ml de cloruro de sodio 0.02 M enfriado a 0 °C y ajustar a pH 5.1 con ácido acético 0.05 M, manteniendo la temperatura en 0 °C. En estas condiciones las IgM e IgA precipitan (II), en tanto que la IgG queda en el sobrenadante (I).

OBTENCION DE LA IgG PURIFICADA

5. En un vaso de precipitados de 250 ml colocar el sobrenadante (I) y ajustar a pH de 7.4 con fosfato disódico 0.5 M enfriado a 0 °C, enfriar en un baño de hielo con sal gruesa a -5 °C y añadir gota a gota 30 ml de etanol al 50 % enfriado a -20 °C.

6. Centrifugar a 16650 G durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada a -5 °C.

7. Disolver el precipitado obtenido en 20 ml de cloruro de sodio 0.15 M y añadir glicina a tener como concentración

final 0.04 g como estabilizador y 0.01 % de timerosal como conservador. Mantener en refrigeración.

OBTENCION DE IgM-E IgA PURIFICADAS

8. Disolver el precipitado (II) en 20 ml de agua destilada enfriada a 0 °C, mantener a esta temperatura en un baño de hielo y sal gruesa. Ajustar a pH 5.1 con ácido acético 0.05 M.

9. Centrifugar a 16650 G durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada a 0 °C y se desecha el precipitado.

10. Ajustar el pH del sobrenadante a 5.5 con fosfato disódico 0.1 M y enfriar en un baño de hielo con sal gruesa a -2 a -3 °C y añadir gota a gota 4 ml de etanol al 50 % enfriado a -20 °C. El precipitado contiene la IgA y la IgM.

11. Centrifugar a 16650 G durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada a 2 °C.

12. Al precipitado obtenido, añadir glicina a tener como concentración final 0.2 % y 0.01 % de timerosal como conservador. Poner el producto en refrigeración.

Esta técnica se incorporó ya al banco de datos con la clave RB-001 (Método 2).

Resultados:

Los productos obtenidos reunieron las condiciones de pureza requeridas para utilizarlos para el marcaje, esto se comprobó mediante inmunoelectroforesis.

CAPITULO III

RESULTADOS DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Las pruebas hechas en forma comparativa en el método CIEF utilizando la técnica convencional con placas de agar Noble al 1.5% disuelto en solución reguladora de acetato-veronal, pH 8.6, $\mu=0.01$ y con la misma solución reguladora pero con fuerza iónica de 0.05 para las cámaras del aparato de electroforesis y las placas de agar Noble disuelto en la solución descrita en la 5a Edición de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos para realizar la técnica de Ouchterlony, es decir la solución reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.75$ diluida para tener una fuerza iónica de 0.01 para las placas de gel de agar Noble y 0.05 para las cámaras del aparato, dieron resultados similares en cuanto a la intensidad y posición de la banda de inmunoprecipitado al probarlos en forma comparativa. El sistema Ag-Ac que se empleó fue el suero equino diluido 1:10 y suero antiequino. Lo anterior demuestra que se logra el efecto electroendosmótico en forma absolutamente similar con ambas soluciones reguladoras. Por lo que respecta a la técnica de inmunoelectroforesis (IEF) en la cual la solución reguladora es básica para lograr la separación adecuada de las proteínas contenidas en el plasma, se analizó en forma comparativa la solución reguladora de veronal-acetato pH 8.6 $\mu=0.05$ con la solución reguladora de boratos pH 8.6 $\mu=0.05$ y en ambos casos se obtuvieron resultados absolutamente idénticos en posición, intensidad y número de bandas de inmunoprecipitado.

Para comprobar estos resultados y debido a que el suero antihumano que se utilizo, dió bandas un poco difusas, se probó la técnica con un suero de fuente comercial anti-IgG que dió resultados claros y mostro la separación adecuada por la posición de la banda obtenida de esta proteína, que en nuestro caso es la mas importante, ya que la técnica se aplica como prueba de pureza de los sueros procesados, tanto homólogos como heterólogos.

Así se demostró que para la técnica IEF la solución reguladora de acetato-veronal puede sustituirse por la de boratos sin detrimento de la técnica y con ventajas.

Por lo que respecta a la técnica probada para la purificación de Acs mediante la precipitación con etanol, que tuvo como objetivo simplificar el método descrito por J.C. Nichol y H.F.

¹³Deutsch que aparece en los manuales de laboratorio de los cursos de Inmunología. El producto obtenido reunió las condiciones de pureza que se requieren para utilizar los sueros para el marcaje con fluoresceína, enzimas o radioisótopos. Lo anterior se comprobó por medio de la IEF en la cuarta etapa de este trabajo experimental, utilizando ya la solución reguladora de boratos que previamente se evaluó en la segunda parte de este estudio de tesis.

La técnica probada simplifica sensiblemente los pasos de la técnica convencional de J.C. Nichol y H.F. Deutsch y utiliza reactivos de uso común en un laboratorio, las condiciones de temperatura son mas fáciles de obtener y las soluciones son sencillas en su preparación. Además de las

ventajas anteriores, el rendimiento fué satisfactorio. Por lo que se refiere a la técnica en si, es mas sencilla en su ejecución comparativamente con la que se venia haciendo anteriormente en el curso de Inmunologia(345), y al probarla en manos de los estudiantes dió tambien excelentes resultados.

El único inconveniente, que tambien tiene la técnica probada de Precipitación con etanol es la necesidad de utilizar una centrifuga refrigerada. Esto se solucionó empleando una centrifuga International para frascos de 250 ml colocando hielo finamente picado mezclado con sal gruesa entre el tubo y la camisa.

En resumen la técnica se puede realizar en cualquier laboratorio de docencia por el bajo costo en reactivos, alto rendimiento y la pureza del producto obtenido.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

En las técnicas probadas la solución reguladora de boratos se comprobó que es posible substituir a la solución reguladora de veronal-acetato, a pH 8.6 y $\mu=0.05$ o 0.01, según sea para IEF o CIEF, pues en los experimentos realizados paralelamente la resolución de las líneas de inmunoprecipitado fue analoga, asimismo la solución reguladora de boratos no presenta los problemas del empleo de barbitúricos. El método de purificación de Acs probado ¹ mostró ser mas sencillo ⁷ que el método de Nichol y Deutsch por lo que puede ser también una alternativa en la purificación de Acs.

La metodología reunida en el banco de información, reúne técnicas accesibles a cualquier institución para obtener o sintetizar reactivos de género diferente: orgánico, biológico o clínico, así como soluciones reguladoras para electroforesis. Este trabajo constituye un esfuerzo por reducir el costo de reactivos y abatir en cierta forma la reducción de recursos provocada por la crisis económica, siendo este el objetivo planteado por el CNGFRM en las diferentes Jornadas Nacionales de Educación Farmacéutica.

La información está ya clasificada y cargada en sistema Wordstar, por lo que cualquier institución educativa la puede solicitar al Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C. a través de su Comisión de Educación.

El procedimiento será copiar la o las técnicas que le interesen al solicitante en un disco, o bien si carece del

apoyo de computación Proporcionarle las técnicas ya impresas.

CAPITULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Resumen:

En el presente trabajo de tesis se estructuró en un archivo en Wordstar que comprende diversos métodos para sintetizar, preparar o purificar 18 reactivos orgánicos, 13 biológicos y 3 reactivos para efectuar pruebas clínicas, estos métodos fueron desarrollados y probados por los profesores y tesisistas en la Sección de Química Experimental y Aplicada del Departamento de Química Orgánica, en el Departamento de Biología y por la Sección de Bioquímica Aplicada del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. Además se evaluaron dos soluciones reguladoras para las técnicas de contraelectroforesis y de inmunoelectroforesis que eliminan la necesidad de emplear barbitúricos, cuyo manejo está reglamentado por la SSA. Y se probó un método simplificado para la purificación de ACS mediante la precipitación con etanol.

Conclusiones:

- 1) La creación de este banco de datos sobre reactivos constituye un gran esfuerzo, que fue posible gracias a la valiosa colaboración de varios profesores de la Facultad de Química UNAM y esta información puede ayudar a una reducción sustancial en la compra de reactivos para la docencia.
- 2) El presente trabajo demuestra la factibilidad de substituir la solución reguladora de veronal-acetato en IEF y CIEF por la solución reguladora de boratos que es más económica, fácil

de preparar y que no utiliza reactivos que no están sujetos a control por ser psicotrópicos como la de veronal-acetato.

3) El método probado de purificación de Acs por precipitación con etanol simplifica al método de Nichol y Deutsch (7) y se obtiene IqG con la pureza requerida para utilizarla para el marcaje, se concluye que este se puede utilizar como método de rutina para la purificación de Acs.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA (35)

1. Mareni, A.R., Basualdo, A., Braun, M. INMUNOLOGIA E INMUNOGUIMICA. 4a. Edición. Panamericana. Buenos aires (1989). Pg 71, 672.
2. Vogel, I.A. A TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY. 4th Edition. Longman Inc. N.Y. (1978). Pg 525-526, 563-565, 572, 577-578, 581, 586, 601, 693-694, 714-715, 733-734, 792.
3. Escarante, R.E. OBTENCION DE TRUMBOPLASTINA Y CEFALINA A PARTIR DE CEREBRO DE CONEJO. Tesis Lic. UNAM, Fac. de Química. México, 1984. Pg 35-36.
4. Mateos, J.M.L. ESTUDIO TECNICO-ECONOMICO SOBRE LA FABRICACION DE CLORURO DE BENZOILO. Tesis Lic. UNAM, Fac. de Química. México, 1988. Pg 11-18.
5. Pavlosky, M. TECNICAS DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS. Grupo Cooperativo Latino Americano de Hemostasia y Trombosis. México (1975). Pg 60.
6. Secretaria de Salud. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5a. Edición. Secretaria de Salud. México (1988). Pg 1540.
7. Facultad de Química, UNAM. MANUAL DE INMUNOLOGIA GENERAL. Facultad de Química. México (1986). Pg 3-5, 15-19, 24-31, 37, 38, 43-46, 49-58, 69-75, 78, 87-90.
8. Facultad de Química, UNAM. MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA. Facultad de Química, México (1986). Pg 4-12.
9. Facultad de Química, UNAM. MANUAL DE PRACTICAS DE ANALISIS.

- QUIMICO CLINICOS. Facultad de Química, México (1988). Pg 15.
10. Facultad de Química, UNAM. ANALISIS BIOQUIMICO CLINICOS, PRACTICAS DEL CURSO. Facultad de Química, México (1988). Pg 18
 11. Marambio, D.E. APORTACIONES PERSONALES. Facultad de Química UNAM. México (1989).
 12. Gonzalez, V.G. APORTACIONES PERSONALES. Facultad de Química, UNAM. México (1989).
 13. Campell, H. D. METHODS IN IMMUNOLOGY. A LABORATORY TEXT FOR INSTRUCTION AND RESEARCH. W. A. Benjamin Inc. N.Y. (1963). Pg 28, 30, 76-78, 249-250.
 14. Hood, E. L., Weissman, L. I., Wood, B. W. IMMUNOLOGY. 2nd Edition. Cumming Series in the life sciences. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. California (1984). Pg 75-79.
 15. Lehninger, L. A. BIOCHEMISTRY. 2nd. Edition. Worth Publishers Inc. N.Y. (1975). Pg 162.
 16. Budavari, S. THE MERCK INDEX. 11th. Edition. Merck & Co Inc. N.J. (1989). Pg 139.
 17. Difco Laboratories. DIFCO MANUAL. 9th. Edition. Difco Laboratories. Detroit (1967). Pg 113, 294.
 18. Wistreich, A. G., Lechtman, D. M. MICROBIOLOGY. 3rd Edition. Mcmillan Publishing Co Inc. N.Y. (1980). Pg 230, 250-261
 19. Paul, E. W. FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY. 4th Edition. Raven Press N.Y. (1986). Pg 636-637.
 20. Stites, P. D., Stobo, D. J. INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA. 4a. Edición. El Manual Moderno, S.A. México (1983). Pg 342, 347, 764.

21. Golub, S.E. IMMUNOLOGY: A SYNTHESIS. Sinauer Associates, Inc
Massachusetts (1987). Pg 16-35.
22. Brewster, O.R., Vanderwerf, A.C. CURSO PRACTICO DE QUIMICA
ORGANICA. Alhambra. España (1984). Pg 49-50.
23. Adams, R., Johnson, R.J. LABORATORY EXPERIMENTS IN ORGANIC
CHEMISTRY. 5th Edition. The MacMillan Company. N.Y. (1969)
Pg 207, 217.
24. Sallé, A.J. FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY. 7th
Edition. McGraw Hill Book Company. N. Y. (1975). Pg 948.
25. Bustos, C.A. BACTERIOLOGIA DE ZINSSER. 2a Edición. Utea.
México (1960). Pg 514.
26. Rawn, J.D. BIOQUIMICA. Vol 1. 1.a Edición Interamericana
Madrid (1989). Pg 62.
27. Bailey, W.R. and Scott, E.G. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. 7th
Edition. The C.V. Mosby Company. St Louis (1986). Pg 440.
28. Jawetz, E., Melnick, L.J. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA.
7a Edición. El Manual Moderno. México (1977). Pg 252.
29. Wesley, A.V. ESSENTIALS OF MEDICAL MICROBIOLOGY.
J.B. Lipincott Company. Philadelphia (1978). Pg 174.
30. Solomons, G.T. FUNDAMENTOS DE QUIMICA ORGANICA. Limusa.
México (1988). Pg 409, 592.
31. Cram, J.D., Hendrickson, B.J. ORGANIC CHEMISTRY. 3rd. Edition
International Student Edition. Mc GrawHill Kogakusha.
LTD. Tokio (1970). Pg 129-130.
32. Moore, A.J., Dalrymple, L.D. EXPERIMENTAL METHODS IN OR
GANIC CHEMISTRY. 2a Edición. W.B. Saunders Co. U.S.A.
(1976). Pg 15-23.

33. Roberts, D. J., Caserio, M. C. BASIC PRINCIPLES OF ORGANIC CHEMISTRY. W.A. Benjamin Inc. U.S.A. (1964) Pg 263.
34. Benacerraf, B., Unanue, R. E. INMUNOLOGIA. 2a Edición. Panamericana. Buenos Aires (1986). Pg 52.
35. Dominguez, A. E., Velez, G., Pombo, D. MANUAL DE INTRODUCCION A LAS TECNICAS DE INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA. Fac. de Química, UNAM, México (1984). Pg 11.

CLAVE RO-001 ACETANILIDA

Uso: Recristalización de compuestos.

Técnica:

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml 20.5 g (20 ml) de anilina y añadir 27.7 g (25.6 ml) de anhídrido acético destilado y 1.0 ml de ácido sulfúrico. Agitar para hacer una mezcla homogénea y dejar reposar por 15 min y verter en 100 ml de agua. Agitar vigorosamente y enfriar en un baño de hielo. Filtrar en un embudo Buchner con succión y lavar la acetanilida con pequeñas porciones de agua. Secar al aire.

El punto de fusión es 113-115°C. El rendimiento es del 95%.

(2, 11, 22, 30, 31, 32)

CLAVE RO-002 ACETATO CUPRICO

Uso: Catalizador en reacciones orgánicas

Técnica:

Pesar en una capsula de porcelana, 60 g de ácido acético y agregar 79.5 g de óxido cúprico. Calentar suavemente hasta sequedad, dejar enfriar y pulverizar en un mortero. (11, 33)

CLAVE RO-003 ACIDO PICRICO

Uso: Síntesis de piridinas.

Técnica:

1. Colocar 10 g de fenol en un matraz redondo de 1000 ml, añadir 23 g (12.5 ml) de ácido sulfúrico conc. Agitar y calentar en un baño de agua hirviendo por 30 min. Después enfriar el matraz en un baño de hielo-agua. Trabajando en la campana de extracción añadir 38 ml de ácido nítrico conc. Mezclar y agitar por unos segundos, dejar reposar. Generalmente la

reacción se efectúa en un minuto liberando vapores de color rojo.

2. Calentar el matraz en un baño de agua por 1.5-2 h con agitación ocasional. Añadir 100 ml de agua fría y enfriar en un baño de agua helada.

3. Filtrar los cristales en un embudo Büchner y lavar con agua (para eliminar el ácido nítrico) y secar. Recristalizar con alcohol diluido (1:2 alcohol-agua). Secar entre hojas de papel filtro en un desecador. El rendimiento de ácido picrico es de 16 g y el punto de fusión es de 122-123 °C. (11,33)

CLAVE RU-004 ACIDO SULFANILICO

Uso: Síntesis de anaranjado de metilo.

Técnica:

1. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml 20.4 g (20 ml) de anilina previamente destilada y añadir con precaución 74 g (40 ml) de ácido sulfúrico conc. en porciones de 2-3 ml, agitar suavemente (durante la adición, sumergir el matraz en un baño de agua helada).

2. Trabajando en la campana de extracción, colocar el matraz en un baño de aceite y calentar a 180-190 °C por 3 h (Nota 1).

La sulfonación se completa cuando una muestra (2 gotas) se disuelven completamente en 3-4 ml de NaOH 2 N sin que la solución se enturbie. Dejar enfriar a 50 °C.

3. Con agitación constante vaciar la mezcla en 400 g de agua o hielo picado. Dejar reposar por 10 min y recolectar el precipitado (ácido sulfanilico) en un embudo Büchner, lavar con agua y disolver el ácido sulfanilico crudo en el volumen

minimo de agua caliente (450-500 ml). Si el producto es colorido, añadir carbón activado y hervir 10-15 min.

4. Filtrar en un embudo precalentado previamente en un baño de agua caliente y recibir el filtrado en un matraz tambien precalentado en el baño de agua.

5. Al enfriar el matraz se separa el ácido sulfanílico en cristales incoloros. Filtrar en un embudo Büchner con succión y lavar los cristales con 10 ml de agua fria. Secarlos con papel o en desecador. El rendimiento es de 20-22 g. Los cristales son eflorescentes y se descomponen sin fundir a 288 °C.

Nota 1: Si se añade a la mezcla de sulfato de anilina 40 ml de una solución de ácido sulfúrico fumante al 10% la sulfonación es mucho mas rápida y el tiempo de calentamiento se reduce a una hora. (2,11,22)

CLAVE RO-005 ANILINA
Uso: Síntesis de yodobenceno.

Técnica:

1. Colocar 40 ml de agua y 30 g de fierro (clavos cortados lo mas pequeño posible) y 21 g (21 ml) de nitrobenceno en un matraz redondo de 500 ml de una boca. Calentar en un baño de agua a 60 C.

2. Añadir un ml de nitrobenceno y 2.5 ml de HCl conc. agitar y mantener la temperatura de 80-90 °C. Añadir el nitrobenceno en porciones de 1-2 ml cada vez, por un periodo de 20-30 min.

3. Adicionar 5 g de carbonato de sodio anhidro y destilar por arrastre de vapor hasta que el destilado esté límpido.

4. Medir el volumen total del destilado, transferirlo a un

embudo de separación y añadir 20 g de sal comercial por cada 100 ml de líquido. agitar hasta que se disuelva.

Separar la fase orgánica y extraer 2 veces con 40 ml de éter la fase acuosa.

5. Secar las fases orgánicas con carbonato de potasio anhidro y agitar por varios minutos, se elimina el éter por destilación y el residuo se destila a presión reducida. El rendimiento es de 18 g aproximadamente y el punto de ebullición es de 174-176 °C. (2.11)

CLAVE RO-006 ACETOFENONA

Uso: Identificación de aldehídos y cetonas.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 500 ml de 2 bocas seco, con un condensador en posición vertical y un embudo de separación a la salida del refrigerante, se conecta un tubo de escape que termine en un embudo invertido, el cual estará sumergido en 200 ml de agua. Colocar 80 g de cloruro de aluminio anhidro, 108 g (123 ml) de benceno seco y 26 g (24 ml) de anhídrido acético redestilado y exento de humedad (añadirlo durante un lapso de 1.5 h agitando el matraz, (La reacción es exotérmica).

2. Calentar en un baño de agua hirviendo por 30 min para completar la reacción, enfriar y vaciar el contenido del matraz en una mezcla de 150 g de hielo picado y 150 ml de HCl. Agitar hasta que las sales de aluminio se disuelvan.

3. Extraer con 25-30 ml de éter, separar la fase orgánica y extraer 2 veces con éter la fase acuosa, juntar las fases

orgánicas. Lavar los extractos combinados de éter y benceno con 50 ml de NaOH al 10 %. después con agua. separar la fase orgánica y secarla con sulfato de sodio anhidro o cloruro de calcio. Eliminar el éter y el benceno y separar la acetofenona. El rendimiento es del 80 %.

Se puede recobrar el disolvente destilando en un baño de agua hirviendo. (2.11.32)

CLAVE RO-007 BENCILO

Uso: Síntesis de ácido benílico.

Técnica:

1. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, 20 g de benzoina y 100 ml de ácido nítrico conc. Trabajando en la campana de extracción, calentar en un baño de agua hirviendo con agitación ocasional por 2 h.
2. Vaciar la mezcla de reacción en 300-400 ml de agua helada, agitar hasta que cristalice completamente como un sólido amarillo. Filtrar el bencilo crudo por un embudo Büchner con succión y lavarlo con agua para eliminar el ácido nítrico.
3. Recristalizar con etanol (2.5 ml por gramo). El rendimiento de bencilo puro es 19 g. El punto de fusión es de 94-96 °C.
(2.11.32)

CLAVE RO-008 M-DINITROBENCENO

Uso: Síntesis de m-nitroanilina.

Técnica:

- A. En este primer paso se prepara el nitrobenzono que se va a utilizar para la preparación del m-dinitrobenzono en la segunda parte de esta técnica.

1. Colocar 50 g (35 ml) de ácido nítrico conc. en un matraz redondo de 500 ml y añadir con agitación, en porciones de 3-4 ml 74 g (40 ml) de ácido sulfúrico conc. Mantener la mezcla en un baño de hielo durante la adición.

2. Colocar un termómetro (25-160°C) en la mezcla y añadir 26 g (30 ml) de benceno en porciones de 2-3 ml, agitar después de cada adición, la temperatura no debe subir a más de 55°C (sumergir en un baño de agua fría si es necesario).

3. Cuando se haya añadido todo el benceno, colocar el condensador en posición vertical y calentar en un baño de agua que se mantiene a 60°C por 40-45 minutos.

4. Retirar el matraz del baño de agua agitando vigorosamente de vez en cuando. Vaciar el contenido en 500 ml de agua fría, agitar bien para eliminar tanto como sea posible el ácido y dejar reposar hasta que el nitrobenceno se deposite en el fondo del matraz.

5. Decantar el ácido y transferir el líquido residual a un embudo de separación, agitar y separar la capa inferior de nitrobenceno y desechar la fase acuosa.

6. Extraer la fase orgánica con 50 ml de agua, separar el nitrobenceno y vaciarlo en un matraz con 5 g de cloruro de calcio anhidro. Filtrar el producto por gravedad a un matraz de 250 ml y conectarle un condensador de aire.

7. Destilar colectando la fracción que hierve a 196-201°C. No destilar completamente a sequedad ni permitir que la temperatura suba arriba de 214°C, ya que los compuestos nítricos son explosivos. El rendimiento de nitrobenceno es de

35 g. El nitrobenzeno puro es un liquido amarillo pálido con punto de ebullición de 210 °C a 760 mm de Hg.

B. OBTENCIÓN DE M-DINITROBENCENO

Técnica:

1. Colocar 37.5 g (21 ml) de ácido sulfúrico concentrado y 22.5 g (15 ml) de ácido nítrico fumante en un matraz redondo de 500 ml. Añadir fragmentos de vidrio, colocar el condensador en posición vertical (debe hacerse en campana).
2. Trabajando en la campana de extracción, añadir lentamente en porciones de aproximadamente 3 ml, 15 g (12.5 ml) de nitrobenzeno; agitar después de cada adición.
3. Calentar la mezcla en un baño de agua, con agitación frecuente. Enfriar la mezcla, vaciarla con precaución y agitando en 500 ml de agua helada; así precipita el dinitrobenzeno.
4. Filtrar por un embudo Büchner con succión, lavar con agua y secar. Transferir el dinitrobenzeno crudo a un matraz redondo más pequeño y colocar el condensador de reflujo, añadir 80-100 ml de etanol y calentar en un baño de agua hasta que el sólido cristalino se disuelva.
5. Al enfriar el matraz, se obtienen cristales incoloros. Si el punto de fusión es inferior a 89-90 °C, se recrystaliza nuevamente. (2.11)

CLAVE RD-009 ACETATO DE SODIO

Uso: Síntesis de isoxazoles.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 500 ml con un refrigerante en

posición vertical, colocar 116 g de acetato de butilo y 40 g de hidróxido de sodio al 50%. someter a reflujo por 2-3 horas, luego se adapta un equipo de destilación simple y se calienta hasta que destile todo el butanol, ajustar a pH de 7.5 el residuo y evaporar el agua.

2. Someter a fusión acuosa e ignea al acetato de sodio para obtener el producto anhidro. (2,11,31)

CLAVE RO-UU10. P-NITROANILINA

Uso: Síntesis de p-nitroacetanilida.

Técnica:

A. Preparación de p-nitroacetanilida.

1. En un matraz redondo de 500 ml, colocar 25 g de acetanilida seca en polvo y añadir 25 ml de ácido acético glacial y 92 g (50 ml) de ácido sulfúrico conc. (la reacción es exotérmica), colocar al matraz en un baño de hielo y agitar.

2. Con el matraz en el baño de hielo, colocar en un embudo de separación una mezcla de 15.5 g (11 ml) de ácido nítrico conc. y 12.5 g (7 ml) de ácido sulfúrico conc. y cuando la temperatura de la solución sea de 0-2°C añadir gradualmente la mezcla de ácidos y mantener la temperatura abajo de 10°C.

3. Después que se ha añadido toda la mezcla, retirar del baño de hielo y dejar a temperatura ambiente por 1 h.

4. Vaciar la mezcla de reacción en 250 g de hielo picado, con lo cual se precipita la p-nitroacetanilida. Dejar reposar 15 min, filtrar por un embudo Büchner con succión, lavar con agua fría. El rendimiento de p-nitroacetanilida cristalina incolora es de 20 g. El punto de fusión es de 214 °C.

B. Preparación de p-nitroanilina.

1. Calentar una mezcla de 15 g de p-nitroacetanilida y 10 ml de hidroxido de sodio al 20% en un matraz de 500 ml conectándole un condensador de agua a reflujo por 20-30 min. Vaciar la solución caliente en 500 ml de agua helada.

2. Cuando se enfria, filtrar el precipitado amarillo cristalino por succión, lavarlo con agua y secarlo. Puede ser cristalizado con una mezcla de etanol/agua. Filtrar, lavar y secar. El rendimiento de p-nitroanilina es de 11 g. El punto de fusión es de 148 °C. (2,11,30)

CLAVE R0-0011- N,N-DIMETILANILINA

Uso: Identificación de aminas.

Técnica:

1. Colocar 28 g (27.5 ml) de anilina pura y 28 g (23 ml) de sulfato de dimetilo purificado en un matraz de 500 ml conectándole un condensador en posición vertical. Calentar suavemente al principio y retirar el mechero cuando la reacción comience a ser exotérmica.

2. Calentar suavemente a reflujo por 2 h. Enfriar la mezcla a 50 °C y verificar el pH de la solución, si es ácido. Añadir una solución de hidroxido de sodio al 20% p/v y poner a reflujo una hora más, después vaciar la mezcla a un vaso de precipitados y dejar que se enfrie hasta temperatura ambiente.

3. Separar la fase oleosa de la amina del sulfato de sodio sólido. lavar con agua y extraer con hexano la fase acuosa.

4. Secar el extracto combinado de hexano-aceite con sulfato de sodio anhidro, destilar el hexano y tratar al residuo con un volumen igual de anhídrido acético y dejar reposar 24 h. (El

anhidrido acético remueve cualquier monoalquilanilina presente).

5. Añadir ácido clorhídrico (20 ml de ácido y 30 ml de agua), agitar hasta que la base se disuelva, extraer con 2 porciones de 30 ml de hexano y añadir sosa al 25% a la fase acuosa para liberar la base.

6. Colectar la fase oleosa, al extraer con hexano, secar la solución orgánica con sulfato de sodio anhidro y eliminar el disolvente en un baño de agua. Destilar el residuo, usando un condensador de aire y colectar la dimetilanilina a 182-184 °C.

El rendimiento es de 28 g. (2,11)

CLAVE RO-0012 CLORURO DE BENZOILO

Uso: Síntesis de benzoato de etilo.

Técnica:

A. Preparación de triclorotolueno

1. En un matraz Morton de 3 litros, adaptado con un termómetro, refrigerante y sistema de entrada para cloro (fig 1), colocar 1250 g de tolueno, grado técnico. El matraz se ilumina con un reflector de 500 Watts para llevar a cabo la reacción. Comenzar el calentamiento suavemente hasta alcanzar una temperatura de 65 °C y comenzar la cloración a un ritmo lento y constante.

2. Al poco tiempo (aprox. 5 min) se apaga el calentamiento, pero se deja el reflector muy cerca del matraz de reacción y manteniendo la adición de cloro en forma constante. La reacción se lleva a cabo en un tiempo aproximado de 25 h manteniendo una temperatura de 75 °C.

3. Separar el producto de la mezcla de reacción por destilación fraccionada a una temperatura de 83 °C y 15 mm de Hg. Se obtienen 1676 g de triclorotolueno (63%).

B. Preparación de cloruro de benzoilo.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 3 litros adaptado con un condensador para reflujo, termómetro y trampa para capturar el ácido clorhídrico que se genere, colocar 212.4 g de ácido benzoico, grado técnico.

2. Calentar y utilizando además agitación magnética, hasta que se funda completamente el ácido, aproximadamente a 130 °C. después de lo cual se añade gota a gota mediante un embudo de separación, 340 g de triclorotolueno durante un lapso de 2.5 horas.

3. Después de 11 h de reacción, detener la agitación y enfriar el sistema. Recuperar el producto obtenido por destilación de la mezcla de reacción a una temperatura de 60 °C y 9 mm de Hg.

4. Se obtienen 429.4 g de cloruro de benzoilo (89.6%). La pureza del cloruro de benzoilo es del 99%. (4.11,31)

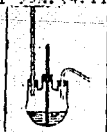


Fig 1

CLAVE RO-UU13 CLOROBENCENO

Uso: SEA, Nitración de clorobenceno.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 250 ml, colocar 78 g de benceno anhidro y 30 g de clavos cortados lo más pequeño

posible, calentar en un baño de agua y mantener a una temperatura que no exceda a 60 °C.

2. Burbujear gas cloro, hasta que el peso del matraz se incremente en 40 g.

3. Enfriar y lavar con solución de carbonato de sodio al 10% hasta pH neutro. La fase orgánica se separa y se destila, recolectando la fracción que corresponde al clorobenceno. (2,11)

CLAVE RO-0014 P-DICLOROBENCENO

Uso: Análisis cualitativo elemental.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 250 ml, colocar 78 g de benceno anhidro y 30 g de clavos cortados lo más pequeño posible, calentar en un baño de agua y mantener a una temperatura que no exceda a 60 °C.

2. Burbujear gas cloro hasta que el peso del matraz se incremente en 70 g.

3. Enfriar y lavar con solución de carbonato de sodio al 10% hasta pH neutro; la fase orgánica se separa y se destilan los disolventes volátiles (benceno y clorobenceno) el residuo se enfria y se cristaliza. (2,11,22)

CLAVE RO-0015 BÉNZALDEHIDO

(Purificación de benzaldehído comercial.)

Uso: Síntesis de dibenzalacetona.

Técnica:

1. Lavar 50 g (48 ml) de benzaldehído grado técnico en un embudo de separación, con varias porciones de hidróxido de

calcio al 10% despues lavar con agua.

2.Secar sobre 5 g de sulfato de sodio anhidro o cloruro de calcio anhidro. Añadir 0.5 g de hidroquinona o catecol durante el secado (ya que el benzaldehido se oxida fácilmente por el oxigeno atmosferico, dando acido benzoico).

3.Filtrar, en papel filtro humedo a un matraz Claisen y destilar a presión reducida. Colectar el benzaldehido que destile 1°C por arriba o abajo del punto de ebullicion verdadero. El punto de ebullición adecuado a presión reducida obtenido en el aparato se puede interpolar de los siguientes datos de puntos de ebullición: 79°/25 mm: 69°/15 mm: 62°/10 mm de Hg. Añadir 0.05 g de hidroquinona al producto. (11.31.32)

CLAVE RO-0016 O-FENILENDIAMINA

Uso: Síntesis de bencimidazol.

Técnica:

1. En un matraz de 3 bocas de 500 ml, adaptar un condensador en posición vertical y colocar 46 g de o-nitroanilina, 27 ml de hidroxido de sodio al 20% y 170 ml de etanol.

2. Agitar la mezcla vigorosamente y calentar en un baño de agua hasta que hierva suavemente. Retirar el baño y añadir 90 g de zinc en polvo en porciones de 5 g (reacción violenta). Al terminar la adición, poner a reflujo con agitación mecánica por 1 h.

3. Filtrar la mezcla caliente en Büchner con succión, lavar el sólido con dos porciones de 100 ml de etanol. Combinar los extractos con el filtrado, añadir 2 g de hiposulfito de sodio y concentrar la solución a presión reducida en un baño de

vapor a un volumen de 80-100 ml. Enfríar la solución en un baño de hielo y sal, filtrar en Büchner con succión y recolectar los cristales amarillo pálido del embudo Büchner, lavar una sola vez con 10-15 ml de agua helada y secar en desecador al vacío. El rendimiento de o-fenilendiamina es de 33 g. El punto de fusión es de 98-100°C.

(11,22)

CLAVE RO-0017 BENZOINA

Uso: Síntesis de bencilo.

Técnica:

1. En un matraz de 500 ml, colocar 65 ml de etanol, 50 g (47.5 ml) de benzaldehído puro y una solución de 5 g de NaCN 96-98% en 50 ml de agua.

2. Colocar el condensador en posición vertical y hervir la mezcla suavemente por 1.5 h. Enfríar el matraz en un baño de hielo. Filtrar la benzoína cruda, lavarlos con bastante agua fría y secar. El rendimiento de benzoína cruda (agujas blancas o amarillas) es de 45 g. Se puede recrystalizar (8 ml por gramo) de etanol y al enfríar se separa la benzoína (sólido cristalino blanco). El punto de fusión es de 137°C. (2,11)

CLAVE RO-0018 BENZOFENONA

Uso: Identificación de aldehídos y cetonas.

Técnica:

1. En un matraz redondo de 500 ml, colocar 200 g de tetracloruro de carbono y 20 g de tricloruro de aluminio, sumergirlo en un baño de hielo y añadir 150 g de benceno gota a gota (cuidar que la temperatura no suba a mas

de 10 °C) una vez agregado el benceno, agitar por 1 h.

2. Agregar 200 ml de agua fría. Las 2 fases se separan en un embudo y la fase acuosa se extrae con 120 ml de éter. Reunir las fases orgánicas.

3. Evaporar el éter y el residuo se trata con 20 ml de hidróxido de calcio en solución. Colocar el condensador en posición vertical y calentar a reflujo por 3 h.

4. Vaciar la mezcla aún caliente a un vaso de precipitados, enfriar y el sólido obtenido se filtra en Buchner con succión y se recristaliza en metanol o hexano.

(2, 11, 22, 23)

CLAVE RB-001 ANTICUERPOS PURIFICADOS

Uso: Marcaje de anticuerpos

Precipitación con sulfato de amonio (Método 1)

Fundamento: Las gamma-globulinas precipitan por la adición de sulfato de amonio en solución saturada, mediante el "efecto salino" ya que a temperatura y pH constantes la solubilidad de una proteína esta en función de la concentración de sales. El producto final es una mezcla de todos los Acs contenidos en el suero inmune. (7,8,15,18)

Técnica:

1. Adicionar a 50 ml de suero hiperinmune, 25 ml de solución saturada a temperatura ambiente de sulfato de amonio, la adición se hace gota a gota y con agitación magnética (si no se tiene esa cantidad de suero, calcular la cantidad de sulfato requerida). Al principio se forma un precipitado que se redisuelve inmediatamente, adicionar la siguiente gota de solución de sulfato cuando el precipitado se haya rediseuelto completamente. Posteriormente el precipitado ya es persistente pero la adición de la solución de sulfato debe seguirse haciendo gota a gota.

2. Cuando se ha terminado de adicionar el sulfato de amonio se ajusta el pH de la suspensión a 7.8 con NaOH 2N. Cuando se trabaja con cantidades menores de las especificadas aquí, se emplea una solución 0.5-1 N, y cuando se trabaja con cantidades mayores (100 ml o más), debe emplearse NaOH 4-5 N.

3. Continuar con la agitación magnética por 2 a 3 h, y centrifugar la suspensión a temperatura ambiente por 30 min a

600 G. Este precipitado contiene gamma-globulina pero impurificada con trazas de albumina.

4. Decantar y desechar el sobrenadante. Disolver el precipitado en el volumen original (50 ml) de ssi.

5. Realizar dos precipitaciones mas en las mismas condiciones. Disolver el precipitado obtenido de la tercera precipitación en 1/2 del volumen original (25 ml) de ssi amortiguada con boratos.

6. Eliminar el sulfato de amonio por diálisis contra ssi amortiguada con boratos PH 8.6. cambiando esta solución por lo menos dos veces al día y manteniendo el dispositivo de diálisis a 4°C hasta que el dializado de negative la reacción de sulfatos. (Al adicionar unas gotas de una solución al 10% de cloruro o de hidróxido de bario a una muestra del dializado no debe formarse un precipitado blanco). Centrifugar a 4 °C por 30 min a 600 G para eliminar las partículas de sólidos.

7. Para conservar el producto, esterilizarlo por filtración. liofilizarlo o bien adicionar un conservador (0.01 % de tiomersal o de azida de sodio).

Solución salina amortiguada con boratos PH 8.6

Acido bórico (H BO) 0.62 g

^{3 3}
Borax (Na B O .10H O) 0.95 g

^{2 4 7 2}
Cloruro de sodio (NaCl) 0.44 g

Agua (H O) cbp 100 ml

Para preparar la solución salina isotónica amortiguada

mezclar 400 ml de este amortiguador de boratos con 8000 ml de solución salina isotónica.

Precipitación con etanol (Método 2)

Fundamento: La solubilidad de una proteína varía con el pH, temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio. El etanol por tener una constante dieléctrica más baja que la del agua, al ser adicionado a la solución de proteínas, baja la constante dieléctrica del medio, lo que incrementa la atracción entre las cargas opuestas, baja el grado de ionización de los grupos iónicos de las proteínas, cesa la repulsión de las cargas análogas y las moléculas tienden a coalescer y precipitan.

Técnica:

Todo el proceso se lleva a cabo con reactivos y recipientes rodeados con hielo y sal gruesa para alcanzar la temperatura que se indica. El etanol se adiciona gota a gota desde un embudo de separación que tiene adaptado una pipeta capilar para que el tamaño de las gotas sea pequeño. Las mezclas se hacen con agitación magnética.

1. Diluir el suero 1:3 en agua destilada, enfriar a 0 °C y ajustar a pH 7.7 con fosfato disódico 0.5 M.
2. Agitando continuamente, añadir alcohol al 50% enfriado a -20°C, hasta obtener una concentración final en etanol del 20%. La temperatura de la mezcla en esos momentos es de alrededor de -5°C. La mayor parte de las inmunoglobulinas precipitan en esas condiciones y se las separa por

centrifugación a 16650 G durante 30 min a -5°C.

3. Disolver el precipitado en cloruro de sodio 0.02 M enfriado a 0 °C y ajustar el pH a 5.1 con ácido acético 0.05 M, manteniendo la temperatura indicada. En esas condiciones IgM e IgA precipitan (II), en tanto que la IgG queda en el sobrenadante (I).

IgG purificada.

4. Ajustar el sobrenadante (I) a pH 7.4 con fosfato disódico 0.5 M enfriado a 0°C y añadir alcohol al 50 % enfriado a -20°C hasta una concentración final en etanol del 25 %, manteniendo la temperatura de -5°C. La IgG precipita en esas condiciones y se la puede separar por centrifugación a 16650 G durante 30 min a -5 °C.

5. Disolver el precipitado obtenido en cloruro de sodio 0.15 M y añadir 0.2 % de glicina como estabilizador o se liofiliza. Si se conserva en solución se debe adicionar 0.01 % de merthiolate y mantenerlo en refrigeración. Para inoculaciones debe ser previamente filtrado por membranas esterilizantes.

Mezcla de IgM e IgA

6. Disolver el precipitado (II) en agua destilada enfriada a 0°C y manteniendo esa temperatura, ajustar a pH 5.1 con ácido acético 0.05 M. El precipitado se elimina por centrifugación a esa temperatura y el sobrenadante se ajusta a pH 5.5 con fosfato disódico 0.1 M.

7. Añadir etanol al 50 % enfriado a -20°C hasta concentración final del 10 %, manteniendo la temperatura entre -2 y -3°C

durante la operación. El precipitado formado, que contiene IgM e IgA, se separa por centrifugación a 16650 G durante 30 min a temperatura de 2°C y al igual que la IgG, se las puede conservar en solución o liofilizadas.

Separación con DEAE celulosa (Método 3)

Fundamento: En este método se emplea la DEAE celulosa que es un intercambiador iónico que tiene la propiedad de adsorber a todas las proteínas plasmáticas a excepción de las gammaglobulinas porque tienen cargas análogas a la resina. (7,8)

Técnica:

Todos los pasos se llevan a cabo a una temperatura entre 8 y 10°C. El suero por purificar debe tener un título alto de Acs.

1. Dializar 60 ml de suero inmune por un periodo de 8 a 16 horas contra 8 litros de ssi amortiguada con fosfatos. Separar una muestra de 10 ml del dializado para determinar la cantidad de anticuerpos presentes.

2. Humedecer la DEAE celulosa de la siguiente forma:

2.1 Preparar una suspensión acuosa con 45 g de DEAE celulosa limpia y seca, que equivalen a 340-350 g de material húmedo regenerado, colocar un disco de papel filtro en el embudo Büchner y vaciar en este la pasta de celulosa.

2.2 Por succión eliminar todo el líquido que sea posible de la celulosa.

2.3 Adicionar en alícuotas de 100 ml, 500 ml de ssi amortiguada con fosfatos.

2.4 Permitir que la última adición de ssi amortiguada filtre por gravedad, a fin de que el grado de humedad sea el

adecuado. Cuando el flujo de la solución se reduce a gotas ocasionales, dejar 10 min más antes de retirar la celulosa del embudo para pesarla.

3. Pesar 340 g de DEHE celulosa húmeda, pasarlo a un vaso de precipitados de 600 ml y añadir 50 ml de ssi amortiguada y mezclar perfectamente.

4. Lentamente y con agitación magnética continua, adicionar el suero dializado a la suspensión de celulosa.

5. Dejar reposar la mezcla por 5 h.

6. Después que se ha equilibrado el suero, adicionar 100 ml de ssi amortiguada con agitación constante.

7. Filtrar la suspensión por succión, y etiquetar al filtrado como "Fracción I"; esta solución contiene la gamma-globulina con un grado de pureza del 95 al 100 % y aproximadamente el 50 % de los anticuerpos presentes.

8. Obtener la otra fracción, "Fracción II", lavando la celulosa contenida en el Buchner con 50-100 ml de ssi amortiguada; el material obtenido es similar a la Fracción I pero es menos concentrado y contiene un 20 % adicional de Acs.

9. Combinar las Fracciones I y II y reducir su volumen a 30-40 ml por pervaporación o por diálisis inversa.

10. Dializar la gamma-globulina así como la muestra de suero que se separó en el paso 1 contra ssi amortiguada con boratos.

11. Si es necesario, clarificar la solución del paso 10 por filtración en papel Whatman o bien por centrifugación, desechando el sedimento. Determinar el título de Acs presente

en el suero total. De estos resultados calcular la pureza y el rendimiento de la gamma-globulina.

12. Regenerar la DEAE celulosa para reusarla de la siguiente manera:

a. Lavar la celulosa varias veces con volúmenes grandes de agua destilada, usando succión para eliminar el agua. Seguir con un lavado con 200-300 ml de NaOH 0.1 N, después con agua destilada para eliminar el NaOH.

b. Continuar con lavados alternados de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N lavando en cada uno con agua destilada repetir este ciclo de 3 a 4 veces. El ciclo debe terminar con base, seguida con varios lavados con agua destilada.

c. Almacenar la resina como suspensión acuosa o si va a ser usada de inmediato, suspenderla en ssi amortiguada.

Fórmula de la solución salina amortiguada con fosfatos:

Solución 1M de fosfato monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
2 4 2
16 ml.

Solución 1M de fosfato dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
2 4 2
84 ml.

Cloruro de sodio (NaCl) 8.7 g

Agua (H_2O) cbp 10,000 ml
2

CLAVE RB-002 ANTIGENO FLAGELAR (H) DE SALMONELLA TYPHI

Uso: Reacción de Widal

Fundamento: Las bacterias pertenecientes al género Salmonella

en cepas móviles, contienen antígenos flagelares, denominados H. Estos Ags se desnaturalizan por el calor, por eso cuando se desea conservarlos, la inactivación se hace adicionando formalina y dejando a temperatura ambiente por un mínimo de 5 días. (24, 25, 26)

1. Utilizar una cepa móvil de *S. typhi* de 18 h de incubación a 37 °C. en veal-infusión, hacer un frotis y teñirlo al Gram. Deberán observarse únicamente bacilos Gram negativos.

2. Sembrar un tubo de veal-infusión con un inóculo abundante de la cepa de *S. typhi* e incubar 18 h a 37°C. Tomar 8 a 10 ml del cultivo y pasarlos a un matraz de 500 ml con 350 ml de veal-infusión, agitar e incubar de 18 a 24 h a 37°C.

3. Comprobar la pureza, haciendo nuevamente una tinción de Gram. Si la prueba es satisfactoria, adicionar un volumen igual al que ocupa el cultivo de solución salina isotónica formolada al 0.6 % y dejar a temperatura ambiente varios días.

4. Para el cuarto o quinto día probar si ya se destruyó la viabilidad de los microorganismos. Tomar una muestra de 0.5 - 1.0 ml de la suspensión perfectamente agitada y sembrar en dos cajas Petri con veal-infusión agar, extender perfectamente el inóculo e incubar 24-48 h a 37 °C. No debe haber desarrollo bacteriano. Si se obtiene desarrollo dejar transcurrir 3 a 4 días más y repetir la prueba de viabilidad. La prueba es satisfactoria cuando ya no se obtiene desarrollo bacteriano.

5. Dejar reposar la mezcla por 24 h y en condiciones de esterilidad decantar la mayor parte del sobrenadante.

desecharlo y pasar el sedimento a un frasco de centrifuga estéril.

6. Centrifugar a 500 G por 30 min, decantar y desechar el sobrenadante y resuspender el desarrollo bacteriano en 20-30 ml de ssi estéril adicionada del 0.3 de formalina.

7. Tomar 1 ml de la suspensión anterior y adicionar 9.0 ml de ssi, mezclar perfectamente y leer comparando con el tubo No 4 del Nefelómetro de McFarland y multiplicar por el factor de dilución para determinar la cantidad de bacilos presentes en la suspensión. La concentración final de la suspensión para poder utilizarse como antígeno deberá ser de 1.2×10^9 bacterias/ml

8. Adicionar ssi formolada al 0.3% en la cantidad necesaria para tener esta concentración. Para llevar a esta concentración y calcular el volumen de diluyente que se debe agregar se hace el siguiente cálculo:

$$\text{Conc. que se tiene} / \text{conc. que se desea} = \text{Volumen de diluyente que se debe agregar por cada volumen de la suspensión concentrada.}$$

Adicionar el volumen necesario de verde brillante al 1% para tener una concentración final de 1:20.000 y una solución acuosa de violeta de genciana al 1% a tener una concentración final de 1:40.000.

La titulación del Ag se describe en RB-006.

CLAVE RB-003 ANTIGENO SOMÁTICO (O) DE SALMONELLA TYPHI

Uso: Reacción de Widal

Fundamento: Las bacterias pertenecientes al género Salmonella

están divididas en grupos según sus antígenos somáticos (O). Estos antígenos (O) son estables a 100°C y no son afectados por el alcohol o los ácidos diluidos. (8,24,25,27,29)

Técnica:

1. Utilizar un cultivo de *S. typhi* de 18 h de incubación en Veal infusion agar. (VIA) comprobar su pureza, haciendo una tinción de Gram. deberán observarse únicamente bacilos Gram negativos.

2. Sembrar un tubo de VIA inclinado con un inóculo abundante de la cepa de *S. typhi* e incubar 18 h a 37 °C. Adicionar al cultivo, con una pipeta estéril, 10 ml de ssi estéril. Tomar 8 a 10 ml de la suspensión del cultivo y pasarlos a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml con 350 ml de VIA, extender el inóculo por toda la superficie e incubar de 18 a 24 h a 37 °C.

3. Comprobar la pureza, haciendo una tinción de Gram.

4. Si la prueba es satisfactoria, adicionar aproximadamente 100 ml de ssi estéril, y dar al matraz movimiento de rotación para desprender el desarrollo.

5. Empleando un ligero vacío y mediante un aditamento de succión pasar la suspensión bacteriana a un frasco de centrifuga de 250 ml y colocarlo en un baño de agua hirviendo durante 2.5 h, agitando de vez en cuando.

6. Comprobar si ya se destruyó la viabilidad de los microorganismos: tomar 2 ml de la suspensión y sembrarlos

en 2 cajas de Petri con VIA extendiendo perfectamente el inóculo e incubar por 48 h a 37 °C.No debe haber desarrollo de colonias.Si se obtiene desarrollo,calentar 1 h mas y repetir la prueba de viabilidad.La prueba es satisfactoria cuando ya no se obtiene desarrolló bacteriano.

7.Centrifugar la suspensión por 30 min a 600 G o hasta que las bacterias estén completamente sedimentadas y el sobrenadante clero.Eliminar el sobrenadante con el equipo de succión y suspender el desarrollo en 20-30 ml de ssi estéril adicionada de formol al 0.3 % .

8.Tomar 0.5 ml de la suspensión anterior y adicionar 19.0 ml de ssi,mezclar perfectamente y leer comparando con el tubo No 4 del Nefelometro de McFarland multiplicando por el factor de dilución para determinar la cantidad de bacterias presentes en la suspensión.La concentración final de la suspensión debiera ser de 1.2 ⁹ .

9.Adicionar ssi adicionada de formol al 0.3 % en la cantidad necesaria para tener esta concentración.Para llevar a esta concentración y calcular el volumen de diluyente que se debe agregar se hace el siguiente calculo:

Conc.que se tiene/conc.que se desea = Volumen de diluyente que se debe agregar por cada volumen de la suspensión concentrada.

Adicionar el volumen necesario de verde brillante al 1 % para tener una concentración final de 1:20,000 y una solución acuosa de violeta de genciana al 1 % a tener una

concentración final de 1:40.000.

La titulación del Ag se describe en RB-006.

Clave RB-004 ANTIGENOS TOTALES DE S. PARATYPHI A

Uso: Reacción de Widal

La técnica es similar a la descrita para el antígeno H de *S. typhi* clave RB-002.

CLAVE RB-005 ANTIGENOS TOTALES DE S. PARATYPHI B

Uso: Reacción de Widal

La técnica es similar a la descrita para el antígeno H de *S. typhi* clave RB-002.

CLAVE RB-006 ANTIGENOS TOTALES DE BRUCELLA ABORTUS

Uso: Reacción de Huddleson

Fundamento: Las bacterias del género *Brucella* están constituidas por un gran número de fracciones antigénicas diferentes. Las que infectan al humano son: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* y estas comparten antígenos por lo que es posible investigar AC frente a este género empleando una suspensión de *B. abortus*. (7, 24, 25, 27, 28)

Técnica:

1. Utilizar un cultivo de 24-48 h a 37 °C en atmósfera con el 2% de CO₂ en triptosa. Tomar de 8-10 ml del cultivo y pasarlos al matraz Erlenmeyer de 1000 ml con 350 ml de tripticaseína-soya-agar (TSA) y extender el inóculo por toda la superficie e incubar de 18 a 24 h a 37 °C con el 2% de CO₂.
2. Comprobar su pureza haciendo una tinción de Gram, sólo deben

observarse cocobacilos Gram negativos.

3. Si la prueba de pureza es satisfactoria proceder a la cosecha del desarrollo bacteriano. Adicionar al cultivo 10 ml de ssi estéril y dar al matraz movimiento de rotación para desprender el desarrollo.

4. Con el aditamento de succión pasar la suspensión a un frasco centrifuga de 250 ml.

5. Colocar el frasco centrifuga en un baño de agua a 60 °C por 60 minutos, agitando ocasionalmente.

6. Tomar 2 ml de la suspensión inactivada y sembrar en dos cajas de Petri con TA, extender el inóculo e incubarlo a 37°C por 48-72 h. Al cabo de este tiempo no debe haber desarrollo de colonias.

7. Centrifugar la suspensión por 30 min a 600 G o hasta que las bacterias estén completamente sedimentadas y el sobrenadante claro. Eliminar el sobrenadante con el aditamento de succión y suspender el desarrollo en 50 ml de ssi adicionada de formol al 0.5% estéril.

8. Tomar 0.5 ml de la suspensión y adicionar 19.5 ml de ssi, mezclar y leer comparando con el tubo No 4 del Nefelómetro de Mc Farland y multiplicar por el factor de dilución para determinar la cantidad de bacterias presentes en la suspensión.

9. La concentración final de la suspensión para utilizarse como antígeno deberá ser de 1.2 ⁹ bacterias/ml.

Adicionar la cantidad necesaria de ssi formolada para tener esa concentración. Para determinar esta cantidad se aplica la

siguiente formula:

$$\text{Conc. que se tiene} / \text{conc. que se desea} = \text{Volumen de diluyente que se debe agregar por cada volumen de la suspension concentrada.}$$

Adicionar la cantidad calculada de ssi formulada al 0.5 % para tener la concentración adecuada y adicionar el volumen necesario de violeta de genciana al 1 % para tener una concentración final de 1:40.000 y de verde brillante al 1% para tener una concentración final de 1:20.000.

TITULACION DE LOS Ags UTILIZADOS EN REACCIONES FEBRILES

Aglutinación en portacobjetos

1. En una serie de 4 tubos de ensayo, preparar diluciones del antígeno que se preparó: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
2. En una serie de 4 tubos de ensayo, preparar diluciones al 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 de un suero de referencia con título conocido, usando como diluyente ssi. Al mismo tiempo preparar diluciones análogas de un suero control negativo.
3. Con un lápiz graso, marcar en un vidrio común de aproximadamente 20 x 20 cm 4 filas de 4 cuadros.
4. Tomar una muestra del Ag diluido al 1:2 y poner una gota en cada uno de los 8 cuadros. A cada uno de los 4 cuadros superiores, agregar una gota de cada suero positivo al 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 respectivamente. A cada cuadro inferior agregar una gota de las 4 diluciones respectivas del

suero negativo. Mezclar perfectamente las gotas con un palillo de plástico diferente para cada uno.

5. Dar movimiento a la placa, oscilando suavemente. Las diluciones finales de los sueros serán ahora 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640 respectivamente.

6. Leer inmediatamente, colocando la placa sobre una lámpara, la dilución final de la suspensión bacteriana a la cual habrá que diluir el Ag debe ser aquella en la que se obtenga el título del suero control positivo.

Repetir el procedimiento anterior para cada uno de los antígenos.

CLAVE R8-007 HEMOLISINA ANTICARNERO

Uso: Reacc. fijación del complemento

Fundamento: Los eritrocitos procedentes de una especie son magníficos inmunógenos cuando se inyectan a animales de otras especies taxonómicamente alejadas. Los anticuerpos que se obtienen son frente a las determinantes antigénicas que están presentes en la membrana del eritrocito. (1.34)

Técnica:

1. En condiciones de esterilidad tomar 3.0 ml de solución de Aisever en una jeringa de 10 ml y hacer la punción en la vena yugular de un carnero, extrayendo 3.0 ml de sangre. Pasar la sangre a un tubo de centrifuga. Adicionar unos 40 ml de ssi estéril, centrifugar a 69 G 10 min, decantar el sobrenadante y repetir el lavado cuatro veces.
2. Preparar una suspensión al 10 % del paquete celular en ssi estéril que se va a utilizar para la inmunización de los conejos. Esta suspensión se prepara ya directamente en un frasco ampula con tapón de hule perforable.
3. La suspensión deberá conservarse en entre 4 y 6°C hasta el momento de emplearse y puede usarse por 4 días.

ESQUEMA DE INMUNIZACION:

1. Se emplean conejos Nueva Zelanda de 2.5 Kg para la inmunización. Se utilizan las venas marginales externas de las orejas.

La dosis del Ag son de 1 ml por Kg de peso del animal los

siguientes días:

1,2,3,4,6,8,10,13,15 y 17

2. Dejar descansar al animal por 7 días.

3. Hacer la sangría de prueba tomando 2 ml de sangre por punción de la vena marginal de la oreja, pasarlos a un tubo de centrifuga. Dejar coagular y separar el suero por centrifugación.

4. TITULACION DE LA HEMOLISINA

4.1 Obtención de los glóbulos rojos de carnero

1. Tomar 3 ml de sangre del carnero en igual forma que para el inmunógeno. centrifugar a 600 G por 15 min. eliminar el plasma y suspender los eritrocitos en 10 ml de amortiguador de veronal y repetir el proceso tres veces. Medir 0.2 ml del paquete celular y adicionar 9.8 ml de amortiguador de veronal. Los eritrocitos de carnero deben ser frescos. Los lavados pueden hacerse con solución salina isotónica, pero la suspensión final debe hacerse siempre en amortiguador de veronal adicionado de calcio y magnesio.

4.2 Preparación del complemento

Se puede utilizar suero recientemente obtenido de cuyos machos de mas de 500 g de peso o bien se puede usar complemento liofilizado. Medir 0.1 ml de complemento y agregar 2.9 ml de amortiguador de veronal (Dil. 1:30). Esta dilución deberá mantenerse en refrigeración o en baño de hielo hasta el momento de emplearse.

4.3 Preparación de las diluciones del amboceptor hemolítico:

1. Medir en 10 tubos de ensayo (12x75mm) las siguientes cantidades de amortiguador de veronal y adicionar el suero de los conejos o sus diluciones:

Tubo No	Amort.	Suero o sus dil.	Dil. final
1	0.9	0.1	1:10
2	0.9	0.1(1)	1:100
3	2.7	0.3(2)	1:1000
4	0.5	0.5(3)	1:2000
5	1.0	0.5(3) Mezclar, pasar 0.5 al No 8	1:3000
6	1.5	0.5(3) Mezclar, pasar 0.5 al No 9	1:4000
7	2.0	0.5(3) Mezclar, pasar 0.5 al No 10	1:5000
8	0.5		1:6000
9	0.5		1:8000
10	0.5		1:10000

En 9 tubos de ensayo (9 x 75), medir 0.2 ml de cada una de las diluciones a partir de la de 1:1000 (3). En el último tubo no se coloca hemolisina.

Esquema de la reacción

Tubo No	Amboceptor	Compl. 1:30	Susp. G.R	Amort. Veronal
1	0.2(1:1000)	0.4	0.2	0.4
2	0.2(1:2000)	0.4	0.2	0.4
3	0.2(1:3000)	0.4	0.2	0.4
4	0.2(1:4000)	0.4	0.2	0.4
5	0.2(1:5000)	0.4	0.2	0.4
6	0.2(1:6000)	0.4	0.2	0.4
7	0.2(1:8000)	0.4	0.2	0.4
8	0.2(1:10000)	0.4	0.2	0.4
9	---	---	0.2	1.0

Mezclar perfectamente y colocar los tubos en un baño de agua a 37°C y observar en cuales tubos ocurre la lisis. La unidad amboceptor esta dada por la máxima dilución que es capaz de causar hemólisis total. Para emplear el amboceptor en las pruebas de fijación del complemento se debe diluir de manera que en un volumen de 0.2 ml estén contenidas 2 UH. Para facilitar la lectura es conveniente centrifugar los tubos por

unos minutos a 600 G.así los eritrocitos que no fueron lisados se acumulan en el fondo del tubo y se puede apreciar fácilmente cual fue el último tubo que mostró hemólisis total.El título está dado por la recíproca de la dilución de la hemolisina.

Si el título es por lo menos 5000 UH por ml,se procede a hacer la sangría de cosecha,extrayendo de 50 a 60 ml de sangre por punción cardíaca,se deja coagular y se centrifuga a 600 G por 30 min.

5.Medir el volumen total del suero y adicionar un volumen igual de glicerina como conservador,al expresar el título de la hemolisina deberá tomarse en cuenta que al agregar la glicerina el suero ha quedado diluido a la mitad.

6.Cuando se obtiene un título bajo,o se desea incrementar el título ya de por sí alto se dan refuerzos mediante la aplicación del antígeno de Forssman,utilizando una suspensión de *Pasteurella cuniculicida*.La bacteria se cultiva en gelosa nutritiva incubando a 37°C por 24 h.Recoger el desarrollo con ssi e inactivarlo por calentamiento a 56°C por 1 h. o en el autoclave a vapor fluyente,ya que se trata de un Ag termoestable.La suspensión se ajusta con el tubo No 10 del nefelometro de McFarland a tener 3,000 millones de microorganismos por ml y se aplica en dosis de 1.0 ml por vía intraperitoneal los días 11 y 16 o bien al término del esquema de inmunización cuando el título de Acs fue bajo.aplicando 2 dosis a intervalos de 4 días.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

CLAVE RB-008 SUERO ANTIHUMANO

Uso: Técnica de Duchterlony; inmunoelectroforesis.

Fundamento: Cuando un organismo recibe proteínas procedentes de otro taxonómicamente alejado se produce un estímulo antigénico y los anticuerpos que se forman reaccionan específicamente frente a las proteínas que estimularon su formación. A este tipo de anticuerpos se les denomina antiespecie. Cuando se utiliza como Ag el suero total o el extracto muscular se obtiene un suero polivalente, ya que el Ag contiene varias proteínas. (20,21,24)

Técnica:

1. Trabajando en condiciones de esterilidad tomar 40 ml de sangre de banco, inclusive vencida pero que no presente hemólisis, y centrifugar 30 min a 600 G, separar el plasma y pasarlo a un frasco ampula.

2. Trabajando en condiciones de esterilidad, colocar 1.0 ml en un frasco ampula con tapón de hule y adicionar 9.0 ml de ssi estéril y mezclar.

3. Los inmunógenos, tanto el diluido como el concentrado se deben conservar en refrigeración hasta el momento de su empleo.

Esquema de inmunización

Técnica:

Se emplean conejos Nueva Zelanda de por lo menos 2.5 Kg de peso.

Día 1: Inocular por vía intramuscular 0.5 ml de suero o extracto + 0.5 ml de adyuvante de Freund completo.

8: Inocular por vía intramuscular 1.0 ml de suero o extracto + 1.0 ml de adyuvante de Freund completo.

15: Inocular por vía endovenosa 0.2 ml de suero diluido 1:10.

16: " " " 0.5 ml " "

17: " " " 1.0 ml " "

18: " " " 0.2 ml de suero.

19: " " " 0.5 ml "

20: " " " 1.0 ml "

4. Dejar reposar al animal por 7 días y después hacer la sangría de prueba. Tomar 2 ml de sangre por punción de una de las venas marginales de la oreja y se deja coagular. Separar el suero y semicuantificar los Acs por el método de doble difusión en placa de gel de agar (Duchterlony).

5. Si el resultado de la prueba es satisfactorio, hacer la sangría de cosecha, extrayendo de 50-60 ml de sangre por punción cardíaca. Dejar coagular la sangre y centrifugar a 600 G por 30 min. Separar el suero y adicionar etilmercuritosalicilato al 10 % de sodio a tener una concentración final de 0.01 %.

6. Si el resultado de la doble difusión fue negativo o solo se formaron bandas de precipitado difusas, es necesario aplicar 2

dosis mas de inmunogeno de 3 ml cada una por via intraperitoneal a intervalos de 1 semana y dejar descansar al animal 4 a 5 dias, repetir la saneria de prueba y si el resultado ya es satisfactorio, proceder a la sangria de cosecha.

CLAVE RB-007 SUERO ANTIBOVINO

Uso: Técnica de Ouchterlony para identificación de adulteraciones en carnicos.

Preparación del extracto de tejido

Técnica:

1. Mediante unas tijeras o con un al bisturi eliminar la grasa y aponeurosis de un trozo de tejido muscular de aproximadamente 100 g y cortarlo en fragmentos de 0,5 a 1,0 cm.

2. Pesar el tejido y pasarlo a un vaso de licuadora. Adicionar ssi a tener la proporción de una parte de tejido por 2 de ssi (P/V) y triturar hasta que el tejido este perfectamente triturado. Pasar el tejido a un matraz y dejarlo en refrigeración durante toda la noche para extraer la mayor cantidad posible de proteínas.

3. Filtrar la mezcla en un embudo conteniendo varias capas de gasa, exprimiendo ésta al final y en seguida filtrar por Papel de poro grueso.

4. Esterilizar el extracto en filtro Seitz con material filtrante EKS-1, aplicando vacío ligero para que no forme espuma en el filtrado.

5. En condiciones de esterilidad, colocar 1.0 ml en un frasco ampula con tapon de goma perforable y adicionar 9.0 ml de ssi y el resto del extracto en otro frasco ampula.

6. Los extractos tanto el diluido como concentrado deben conservarse de 4-6 °C hasta el momento de su empleo. En lugar de este extracto se puede emplear suero bovino estéril como se describe en la clave RB-008 Suero antihumano.

Esquema de inmunización

Técnica:

Se emplean conejos Nueva Zelanda de por lo menos 2.5 Kg de peso.

Día 1: Inocular por vía intramuscular 0.5 ml de suero o extracto + 0.5 ml de adyuvante de Freund completo.

8: Inocular por vía intramuscular 1.0 ml de suero o extracto + 1.0 ml de adyuvante de Freund completo.

15: Inocular por vía endovenosa 0.2 ml de suero diluido 1:10.

16: " " " 0.5 ml " "

17: " " " 1.0 ml " "

18: " " " 0.2 ml de suero

19: " " " 0.5 ml "

20: " " " 1.0 ml "

2. Dejar reposar al animal por 7 días y después hacer la sangría de prueba. Tomar 2 ml de sangre por punción de una de las venas marginales de la oreja y se deja coagular. Separar el suero y semicuantificar los Ac por el método de doble

difusion en placa de gel de agar (Wuchterlonv).

3. Si el resultado de la prueba es satisfactorio, hacer la sangria de cosecha, extrayendo 50-60 ml de sangre por punción cardiaca. Dejar coagular la sangre y centrifugar a 600 G por 30 min. Separar el suero y adicionar etilmercuritiosalicilato al 10 % de sodio a tener una concentración final de 0.01 %.

4. Si el resultado de la doble difusion fue negativo o sólo se formaron bandas de precipitación difusas, es necesario aplicar 2 dosis mas de inmunogeno de 3 ml cada una por vía intraperitoneal a intervalos de 1 semana y dejar descansar al animal 4 a 5 días, repetir la sangria de prueba y si el resultado va es satisfactorio, proceder a la sangria de cosecha.

CLAVE RB-0010 SUERO ANTIPORCINO

Uso: Igual antibovino.

La técnica es similar a la descrita para el suero antibovino clave RB-009.

CLAVE RB-0011 SUERO ANTIFOLLO

Uso: Igual antibovino.

La técnica es similar a la descrita para el suero antibovino clave RB-009.

CLAVE RB-0012 SUERO ANTIEQUINO

Uso: Igual antibovino.

La técnica es similar a la descrita para el suero antibovino clave RB-009.

CLAVE RC-001 TROMBINA HUMANA

Uso: Determinación del tiempo de trombina.

La trombina se puede preparar a partir de plasma humano o bovino, ambas preparaciones tienen la misma acción sobre el fibrinógeno humano. (3.5.3.12)

Técnica:

1. Llevar 100 ml de plasma a 1000 ml con agua destilada, ajustar el pH a 5.3 con ácido acético al 2%.

Centrifugar, desechar el sobrenadante y disolver el precipitado en 25 ml de ssi al 0.85% y ajustar el pH a 7 con carbonato de sodio al 2%.

2. El fibrinógeno se coagula agregando 3 ml de cloruro de calcio 0.25M y se retira de la solución. Dejar por 2 h a temperatura ambiente para que se forme la trombina. Esta solución cruda de trombina se purifica adicionando 1 volumen de acetona por cada volumen de solución de trombina cruda.

3. Separar el precipitado por centrifugación y luego extraer del mismo la trombina con 25 ml de ssi 0.85%, centrifugar, desechar el precipitado. La solución de trombina tiene una actividad aprox. de 1000 unidades por ml.

4. Esta solución se fracciona en alícuotas y se congela a - 20

o se liofiliza. La estabilidad de la solución de trombina es mayor cuando se utiliza como diluyente glicerol al 50 % .

CLAVE RC-002 TRUMBOPLASTINA
Uso: Determinación del tiempo de protombina

La tromboplastina se prepara a partir de cerebros obtenidos de conejos adultos sanos sacrificados por invasión de aire.

Extraer los cerebros de inmediato para facilitar la eliminación de vasos sanguíneos. (3, 5, 12)

Técnica:

1. Con un bisturí hacer una incisión longitudinal en la zona central de la piel que cubre la cabeza y el cuello, y con unas pinzas separar la piel para dejar el cráneo al descubierto.

2. Con unas pinzas para hueso cortar la articulación occipital alantoidea, cortar y separar la calota craneana.

3. Cortar la duramadre y extraer el cerebro con el mango de las pinzas. Tan pronto se extrae, colocarlo en hielo sobre papel aluminio. Para limpiar los cerebros desechar la piamadre, el bulbo raquídeo y eliminar todos los vasos sanguíneos que sea posible, con la ayuda de pinzas y bisturí.

4. Colocar los cerebros en un vaso de precipitados y lavar con ssi hasta eliminar todos los residuos de sangre.

5. Los cerebros ya limpios se pasan a un mortero y adicionar 10 ml de acetona por cerebro . agregar 0.1 ml de citrato de sodio al 3.8% por cada 3 cerebros para eliminar las trazas de Ca^{2+} .

6.Extraer el material en un mortero y después eliminar la acetona por decantación:adicionar otra porción igual de acetona y continuar con la extracción:eliminar también esta segunda acetona y añadir una tercera fracción:en este paso el material empieza a adquirir una apariencia escamosa y la acetona estará practicamente limpia. ya que las primeras dos porciones salen opalescentes por la disolución de lípidos.Desechar la tercera porción de acetona ,adicionar una nueva porción y triturar el material hasta obtener una sustancia con apariencia granulosa.

7.Desechar la cuarta porción de acetona por filtración en papel.El polvo de tromboplastina que se obtiene se esparce sobre un papel filtro en una charola,y se coloca a 37°C por 30 min.Posteriormente se coloca a temperatura ambiente por 24 h y finalmente se guarda en refrigeración en un frasco tapado.

CLAVE RC-003 CEFALINA

Uso:Tiempo parcial de tromboplastina

La cefalina se obtiene a partir de tromboplastina por el siguiente procedimiento:

Técnica:

- 1.Adicionar a 3 g de tromboplastina colocados en un frasco con tapón 62.5 ml de acetona,y agitar por inversión por 2 minutos.Dejar reposar la suspensión tapada por 2 h a temperatura ambiente y centrifugar 5 min a 200 G.
- 2.Decantar el sobrenadante, y dejar secar el residuo a temperatura ambiente sobre un papel filtro.
- 3.Transferir el residuo a un vaso de precipitados y adicionar

62,5 ml de cloroformo y mantener con agitación magnética por 2 h. Filtrar a través de un embudo de filtración rápida, recolectar el filtrado y evaporar a temperatura ambiente (aproximadamente 3 días). En el fondo del vaso queda un residuo gomoso amarillo oscuro.

4. Pasar el precipitado, con la ayuda de aplicadores, a un homogeneizador de tejidos y se adicionan 34,5 ml de ISI. Homogeneizar hasta que se obtenga una suspensión lechosa de color amarillo pálido.

5. Dividir la suspensión en alícuotas de 1 ml y congelarlas.

(3.12)