

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA
ESCUELA DE QUIMICA**

INCORPORADA A LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**"Estudio de la Lactalbumina sometida
a Vibraciones Ultrasónicas
Esterilizantes"**

TESIS

QUE PRESENTA LA ALUMNA

EMMA RODRIGUEZ DEL CAMPO

PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE

"QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO"

1 9 4 7



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.

A mis queridos Padres

A la Universidad **Metolita**

INTRODUCCION

Fué Loomis en 1927 (1), con sus experimentos el que estudió, por primera vez de una manera sistemática la acción de las ondas ultrasonoras sobre la materia viva, y quien abrió de una manera definitiva este vasto campo de aplicaciones prácticas; después de él, se han desarrollado numerosos trabajos que han tenido como fin el estudio de esta forma de energía sobre los seres vivos. Son para nosotros los mas interesantes, aquellos que en forma directa o indirecta, verifican la acción de las ondas ultrasónicas sobre los microorganismos, y aquellos que tratan también de explicarla. Mencionaremos como más interesantes los siguientes: Harvey, Harvey y Loomis en 1928 (2), estudian la acción de las ondas de sonido de alta frecuencia sobre la materia viva en el mar, Harvey, Harvey y Loomis, (3), en el mismo año, reportan la acción destructiva sobre las bacterias luminosas y completan mas tarde sus investigaciones (4), concluyendo que sobre tales organismos se manifiesta una acción francamente letal a una frecuencia de 28 megaciclos. Johnson (5), estudia los efectos letales de la radiación ultrasónica mas detenidamente y establece el tiempo necesario de exposición a frecuencias determinadas. Williams y Gaynes (6), observan en forma análoga los efectos bactericidas en suspensiones microbianas. Biancani, Biancani y Dognon, (7), describen su acción sobre las paramecias en función de ciertos factores exteriores, entre los que se encuentran la acción combinada de la luz, los electrolitos y la temperatura, mantenida esta última siempre dentro de variaciones inferiores a la letal. Sobre cultivos de células, la estudian Chambers y Gaines (8), Beckwith y Weaver en 1936 (9), estudian su acción sobre los hongos y bacterias, sobre aquellos mismos experimentan Lui y Yen (10), y Akiyama (11); Kasahara, Ohata y

colaboradores (12), observan su acción sobre el *Hemophyllus Pertussis*. Stanley en 1940 (13), investiga su acción sobre el virus del mosaico del tabaco. Kadono (14), sobre los ficomicetos en presencia de agentes germicidas; ese mismo año Kasahara y Ohata (15), presentan un trabajo con los resultados de someter el virus de la encefalitis a la acción de las citadas ondas.

Los autores anteriormente citados, llegan a la conclusión, de que las vibraciones ultrasónicas, son capaces de manifestar una acción abatidora de la vitaidad o francamente letal, según los diversos organismos a ellas sometidos, acción que está condicionada por la longitus de onda, el tiempo de exposición y la energía aplicada.

El mecanismo de esta acción es explicado en dos formas:

- A).- Por la cavitación, como se deduce de los trabajos de los trabajos de Harvey y Loomis (16), que confirman los de Boyle y Taylor (17), y Boyle, Taylor y Froman (18); y los de Smith (19); y Sollner (20).
- B).- Para los organismos más grandes, como las paramecias, la acción combinada de la cavitación y coagulación, tal fue demostrado por Lui, Szu-Cich y Hsien (21); y por Paic, Dutsch y Borcila (22).

Mas esta forma de energía, tan proteica en su acción, produce también efectos químicos como los de oxidación, observados por Richards y Loomis (23); Flosdorf y Chambers (24); Ozaki, Suenaga y Kogima (25). De polimerización, descritos por Szalay (26). Los de demolición proteica, en condiciones especiales, y activación de los diversos procesos químicos. Marinesco y Marinesco (27), (28).

Tales efectos pueden producir cambios más o menos profundos en las sustancias sometidas a la vibración ultrasónica; esto es fundamentalmente, lo que nos llevó a estudiar la acción de las vibraciones ultrasónicas sobre la albúmina de la leche, que representa el constituyente proteico original de este producto, para ver la factibilidad de esterilizarlo mediante la aplicación de las citadas ondas; ya que solo se ha estudiado la acción de ellas sobre el estado fisico-químico de la leche y su contenido en vitamina C (29), por Kasahara, Tatsumi y Kowski; y por Gaines y Chambers (30).

MATERIAL Y METODOS

Se empleó para la producción de vibraciones ultrasónicas, un generador de cuarzo piezoeléctrico de 28 megaciclos, con una salida final aplicada al cristal de 100 watts efectivos en una superficie de 20 cm², lo que dá un resultado final de 5 watts por cm², suspendido en un baño de aceite sobre una caja metálica llena de aire, según la técnica de Gruetzmacher (31), a fin de obtener una radiación mayor hacia la cara superior en cuyo sentido se introdujo un vaso de vidrio de 250cc. en el que se puso la solución de lactalbúmina, a tratar, en suero fisiológico.

La lactalbúmina fué proporcionada por la casa "Wheyton" cuyo contenido en aminoácidos solo nos fué dado para tres de ellos: la arginina, la histidina y la lisina.

Esta proteina, en opinión de Palmer (32), está constituida en gran parte por lactoglobulina, lo que podemos comprobar ya que solo era francamente "soluble" en solución de NaCl al 8%o.

En la experimentación se preparó una solución al 6.5%o de lactalbúmina en suero fisiológico, para ser sometida a la vibración en el aparato anteriormente descrito. Primeramente se procedió a hacer los controles de esterilización por este método, con el fin de apreciar el tiempo necesario para producir la esterilización, para ello se empleó la solución antes mencionada, esterilizada por filtración a través de discos esterilizantes Zeitz, ésta solución se contaminó con 300 millones de Escherichia Coli por litro, lo que da un tenor en bacterias, doble del de la leche tolerada como la más contaminada. Elegimos la Escherichia Coli como contaminante por ser un germen fácil de cultivar, por que se halla presente en gran proporción de la flora microbiana de las leches, Babel y Parfilit (33), y por que no difiere sensiblemente de otros gérmenes en su resisten-

cia a los ultrasones (34) Los resultados de esta primera experiencia se hallan consignados en la tabla I.

Procedíamos al mismo tiempo a verificar el contenido en los aminoácidos antes mencionados en la lactalbúmina, comparándolo con los resultados que nos fueron proporcionados por la casa productora, lo que hicimos de acuerdo con la técnica de separación de aminoácidos básicos descrita por Kossel y Kutscher (35). Empleando para las determinaciones de nitrógeno, el Semimicrómetro de Hengar (36), encontrando pequeñas divergencias comparables, como se dan en la tabla II. En seguida sometimos la misma solución de lactalbúmina a la acción de las vibraciones por 30; tiempo que se demostró, de acuerdo con los resultados de la tabla I, ser suficiente para producir en estas circunstancias la esterilización y después de ello, procedimos nuevamente a la determinación de aminoácidos anteriormente dosificados Los resultados se hallan en la tabla III.

Como los valores obtenidos en el análisis químico pueden considerarse concordantes, procedimos a investigar si su tamaño molecular no había sido cambiado, ya que de acuerdo con los datos de Marrack (37), pueden encontrarse las proteínas formadas por acúmulos moleculares simples, nos quedó por aplicar un método inmunológico, cuya interpretación por la teoría de Heidelberger y colaboradores (38), (39), (40), (41), (42), nos permitiría apreciar el cambio en la dimensión de la molécula de antígeno, ya que el método de la presión osmótica suele dar, incluso en el caso de proteínas desnaturalizadas, resultados no valederos (35). Para ello administramos a tres conejos, cuyos pesos variaban entre 3.5 y 4.5 Kgs. llamados: A, B y C, 1cc de la solución salina de lactalbúmina original al 6.5%o. por vía endovenosa, cada semana durante cuatro veces, y sangrándolos, después de 10 días de la última inyección, procedimos a la titulación de las precipitinas de acuerdo con la técnica de Hanks (43). Usando una dilución al 1:5000 del antígeno y diluciones crecientes del suero desde 1:100 a 1:3200, y testigos de suero fisiológico, haciendo las lecturas a la hora, 3, 24, 48 y 72 horas, a 37° para la primera y segunda lecturas, y mantenidos a la refrigeradora y llevados a 37°C por una hora antes de hacer la lectura para las tres restantes. Los resultados se hallan consignados en la tabla IV.

El antígeno estaba incorporado en una base de Gelatina Difco 5grs, NaCl 1gr, Fenol 0.5grs, Glicerina 20cc (para aumentar la densidad frente a las altas diluciones del suero) y 80cc de agua destilada. Su pH fué ajustado a 5.3, punto isoeléctrico de la lactalbúmina, por medio de HC 1 N/10.

Repartido el antígeno en tubos de 3mms. de diámetro interno en cantidades de .1cc y sobre él cuidadosamente depositado .1cc de la dilución del suero

Habiendo encontrado satisfactorios los títulos de anticuerpo, procedimos a verificarlos en presencia de la solución de lactalbúmina sometida al tratamiento ultrasónico, suspendida en la misma forma y a la misma dilución 1:5000, que el anticuerpo original, corriendo además al mismo tiempo para tener circunstancias comparables, otra serie como la que nos sirviera para determinar el título. Los resultados se hallan consignados en la tabla V.

DISCUSION

De los resultados en la tabla No. I, se infiere que una exposición por 20 minutos, en el aparato utilizado, a la radiación ultrasónica, es capaz de causar la muerte a los gérmenes contaminantes lo que es satisfactorio para otras especies de acuerdo con el trabajo de Johnson C. H. (34), por lo mismo podemos considerar, de acuerdo con el trabajo de este autor, que este tiempo de exposición, es suficiente para producir la esterilización frente a otros gérmenes. Al dar nosotros 30 minutos de tratamiento a la lactalbúmina, objeto de la experiencia, podemos por lo mismo considerar que estamos dentro de un margen más que suficiente de esterilización; en estas condiciones teniendo a la vista las tablas II y III, en las que apreciamos un contenido verosimilmente análogo en los aminoácidos estudiados, que de acuerdo con Block R. J. (34), son los que juegan un papel importante en el desarrollo genético de las proteínas tisulares, tal importante propiedad de la lactalbúmina, considerada como alimento, no ha sido alterada, y por lo que respecta a su estado disperso, analizando los títulos a que se obtiene una precipitación específica de acuerdo con los trabajos antes citados de Heidelberger, (38), (39), (40), (41) y (42), y colaboradores, al abatirse el título como lo vemos en las tablas IV y V, se infiere que se obtiene un estado disperso mayor, puesto que a este corresponde una cantidad relativamente mayor, de anticuerpos, fijada, con el abatimiento consiguiente del título, lo que confirma los trabajos de Kasahara, Tatsumi y Komski (29), quienes afirman haber observado una estabilidad mayor desde el punto de vista de la emulsión, en la leche total sometida a esta radiación.

CONCLUSIONES

En las condiciones expuestas en el curso de este trabajo, podemos concluir:

- a) El contenido en aminoácidos básicos, (arginina, histidina y lisina) no es alterado en la lactalbúmina, y por ende su capacidad, desde el punto de vista químico, en el desarrollo genético de las proteínas tisulares, cuando es sometida a Vibraciones Ultrasónicas Esterilizantes.
- b) Se altera únicamente su dispersión produciendo un estado disperso mas fino.

RESUMEN

Se estudian de la lactalbúmina, sometida a vibraciones ultrasónicas esterilizantes, las posibles alteraciones en el contenido en aminoácidos básicos, (arginina, histidina y lisina) los mas importantes, desde el punto de vista químico, en la génesis de las proteínas tisulares, y el estado de dispersión, empleando un método inmunológico, de acuerdo con la teoría de Heidelberger de la reacción Antígeno-Anticuerpo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Wood, R. W., and Loomis.— A. L., *Phil. Mag* 4 : 417,1927.
- 2.—Harvey, E. N., E. B. Harvey, and A. L. Loomis.—*Biol. Bull Marine Biol. Lab.* : 55,459,1928.
- 3.—Harvey, E.N., and A.L. Loomis.—*Nature Lond.* : 121,622,1928
- 4.—Harvey, E. N., and A. L. Loomis.— *F. Bacteriology*.....
17,373,1929.
- 5.—Johson, C. H.,— *F. Physiologie*, 67 : 356,1929.
- 6.—Williams, O. B., and W. Gaines.—*F. Inf. Dis.* 47 :
485,1930.
- 7.—Biancani, E., H. Bianceni, and A. Dognon — *C. R. Soc. biol.* 111 : 754,1932.
- 8.—Chambers, L. A., and R. Samisch — *Plant Physiol.* 2 : ..
451,1932.
- 9.—T. D. Beckwith & C. F. Weaver — *J. Bact.* 32:
361-373,1936.
- 10.—S. C. Lui & A. C. H. Yen *Proc. Soc. Exper. Biol& Med.*
32 : 485-488,1936.
- 11.—S. Akuyama — *Tchoku J. Exper. Med* 30 : 192-195,1936.
- 12.—M. Kasahara, S. I. Ogata, K. Yoshida & H. Kambayashi -
Monatschr. f.Kinderh 72 : 11- 17,1938.
- 13.—Stanley, W. M. — *Science, New York.* 80 : 339,1934.
- 14.—M. Kadono — *Far Eats. Sc. Bull.* 2 : 2,1942.
- 15.—M. Kasahara, S. S. Nan & S. Ogata — *Klin Wchnschr.*
19 : 817,1940.
- 16.—Harvey, E. N., and A. L. Loomis — *F. Gen. Physiol.*
15 : 147,1931.
- 17.—Boyle, R. W., and G. B. Taylor — *Phys. Rev.* (II)
27 : 518,1929.
- 18.—Boyle, R. W., G. B. Taylor, and D. K. Froman — *Trans.*
Roy. Soc. Canada (III) 23 : 187,1929.
- 19.—Smith, F. D. — *Phil. Mag.* (VII) 19 : 1147,1935.
- 20.—Sollner, K. — *Trans. Faraday Soc.* 32 : 1537,1936.
- 21.—Liu, Szu-Cich, and Hsien Wu,— *F. Amer. Chem. Soc*
56 : 1005,1934.
- 22.—Paic, M., V. Deutsch, and L. Borcila — *C. R. Soc. biol.*

119 : 1061,1935.

- 23.—Richards, W. T., and A. L. Loomis — *F. Amer. Chem. Soc.* 49 : 3086,1927.
- 24.—Flosdorf, E. W., L. A. Chambers, and W. M. Malisoff — *F. Amer. Chem. Soc.* 58 : 1069,1936.
- 25.—M. Osaki, T. Suenaga & K. Kogima — *Jap J/M. Sc. IV. Pharmacol.* 9 : 194-1945,1936.
- 26.—Szalay, A. — *Z. phys. Chem., Abt. A*, 164 : 234,1933.
- 27.—Marinesco, N. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, 201 : 1187,1935.
- 28.—Marinesco, N. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, 202 : 757,1936.
- 29.—M. Kasahara, M. Tatsumi & K. Koniski — *Ztschr. f. Kinderh.* 59 : 193-197,1937.
- 30.—N. Gaines and L. Chambers — *Phys. Rev (II)* 39 : 862,1932.
- 31.—J. Greutzmacher — *Z. techn. Phys.* 17 : 166,1936.
- 32.—A. H. Palmer — *J. Biol. Chem.* 104 : 359,1934.
- 33.—Babel y Parfitt *J. Dairy Science* 19 : 497,1936.
- 34.—C. H. Johnson — *F. Physiology*, 67 : 356,1929.
- 35.—I. Deschamps — *Análisis de una proteína por el método de Van Slyke*, Tesis p.30,1946.
- 36.—Kossel y Kutscher — Schmidt, Carl L. A., *The chemistry of aminoacids and proteins* (Charles C. Thomas) p. 210,1944.
- 37.—Marrak J. R. — *The Chemistry of antigens and Antibodies*, p.25,1938.
- 38.—Heidelberger M. and F. E. Kendal — *J. Exp. Med* 61 : 563,1935.
- 39.—Heidelberger M. and F. E. Kendal — *J. Exp. Med.* 62 : 467,1935.
- 40.—Heidelberger M. and F. E. Kendal and Soo Hoo C. M. — *J. Exp. Med.* 58 : 137,1933.
- 41.—Heidelberger and Kendal — *J. Exp. Med.* 55 : 555, 1932.
- 42.—Heidelberger and Kendal — *J. Exp. Med* 62 : 607,1935.
- 43.—Hanks J. H. — *Jour of Inn.* 28 : 95,1935.

RESULTADOS

TABLA No. 1
ESTUDIO DEL TIEMPO NECESARIO DE EXPOSICION
A LAS VIBRACIONES ULTRASONICAS PARA CAU-
SAR LA ESTERILIZACION.—RESULTADOS POR C.C.

Tiempo de exposición	Experiencia # I.		Experiencia # II.		Experiencia # III.	
	Solución Lactalbúm.	Testigo	Solución Lactalbúm.	Testigo	Solución Lactalbúm.	Testigo
0'	378000	378000	340000	340000	360000	360000
5'	170000	390000	150000	333000	110000	338000
10'	5000	350000	7000	360000	6000	320000
15'	200	370000	400	370000	300	350000
20'	0	375000	0	333000	0	375000

Los resultados son promedios de la cuenta por diluciones y siembra en agar simple.

RESULTADOS:

TABLA No. II.
CONTENIDO EN AMINOACIDOS BASICOS EN LA LACT-
ALBUMINA ANTES DE SER SOMETIDA AL TRATA-
MIENTO.

	Repor- tado.	E n c o n t r a d o			Prom- dio.
		1/a. Determin.	2/a. Determin	3/a. Determin	
ARGININA...	3.35	2.80	2.95	3.10	2.95
HISTIDINA..	2.3	2.60	2.45	2.40	2.46
LISINA.....	8.5	8.50	8.20	8.30	8.33

RESULTADOS

TABLA No. III.
CONTENIDO EN AMINOACIDOS BASICOS EN LA LACT-
ALBUMINA DESPUES DE SER SOMETIDA AL TRA-
TAMIENTO.

	E n c o n t r a d o			Prome- dio.
	1/a. Determin	2/a. Determin	3/a. Determin	
ARGIGINA.....	2.70	3.20	3.10	3.00
HISTIDINA.....	2.70	2.60	2.40	2.54
LISINA.....	8.70	8.20	8.30	8.40

RESULTADOS

TABLA No. IV.
TITULOS DE LAS PRECIPITINAS EN LOS CONEJOS
A, B y C.

Dilución del Suero		100	200	400	800	1600	3200	Suero Fisiológico	100	200	400	800	1600	3200	Suero Fisiológico	100	200	400	800	1600	3200	Suero Fisiológico
		Dilución del Antígeno 1 : 5000	1h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
3h.	+		+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
24h.	+		+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
48h.	+		+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
72h.	+		+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
		CONEJO A						CONEJO B						CONEJO C								

