

**PURIFICACION Y CONCENTRACION
DE SUEROS TERAPEUTICOS, POR EL
METODO DE DIGESTION PEPSICA**

MARIA INA SANCHEZ TORRES

México, D. F.

1964



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.

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS UN.A.M.

***Purificación y Concentración de
Sueros Terapéuticos, por el Método
de Digestión Péptica***

TESIS

Que para obtener el título de:

QUIMICO

presenta:

MARIA INA SANCHEZ TORRES

México, D. F.

1964

A esos seres tan queridos, sin los cuales
no hubiera llegado a ser ese "algo" en la
vida; a ellos, después de Dios, viviré eter-
namente agradecida por el feliz término de
mi Carrera.

Con profundo agradecimiento:

A mis padres, Ma. Antonia T. de Sánchez y
Angel Sánchez M.

A la memoria de mi Abuela
Fabiana Inés Maldonado,
con veneración.

Con todo cariño: a mis tíos y primos.

Quiero hacer patente mi agradecimiento al Sr. Ing. Manuel Aguayo, Jefe de Producción del Instituto Nacional de Higiene; cuya dirección hizo posible este trabajo.

Con todo respeto dedico esta
Tesis: Al H. Jurado.

**A mis hermanos: Celito, Memo y Mayiya,
con cariño y agradecimiento.**

**Con afecto y estimación a la amiga
y compañera que supo ser:
Srita. Quím. Alicia Hernández Flores.**

A mis compañeros de trabajo.

CAPITULOS

- I.—ANTECEDENTES
- II.—DIGESTION PEPSICA
- III.—EXPERIMENTACION
- IV.—ESTUDIOS DIFERENCIALES POR ELECTROFORESIS
- V.—CONCLUSIONES
- VI.—BIBLIOGRAFIA

ANTECEDENTES

La concentración y purificación de los sueros plantea una serie de problemas cuya importancia no puede negarse. Se sabe en efecto desde hace tiempo que no puede utilizarse un suero con fines terapéuticos, más que cuando contiene un número elevado de unidades antitóxicas. Decir esto equivale a expresar el interés considerable de la concentración de los sueros, pues con esta operación se elevan considerablemente las unidades del producto con grandes beneficios para el paciente, pues el volumen a inyectar se reduce y las reacciones secundarias disminuyen.

Antes de hablar ampliamente de los diferentes métodos de concentración, se debe insistir en la purificación de los sueros, si se quiere enriquecer el suero, exclusivamente en antitoxina.

Desde el inicio de la fisioterapia se achacaron los accidentes séricos al suero total y se ensayaron numerosos métodos para su purificación.

COMPOSICION QUIMICA DEL SUERO NATURAL (1000 ml.)

	<i>GRAMOS</i>
Sero-albúmina	35
Sero-globulinas, euglobulina	15
" pseudo-globulina	25
Sero-mucoide (gluco-proteína)	0.5
Fosfatidas (lecitina, cefalina)	1.50
Colesterina libre	0.35

GRAMOS

Colesterina esterificada	1.50
Glicerina	0.08
Glucosa	1.0
Aldehido acético, aldehido fórmico	huellas
Acido láctico	0.10
Nitrógeno incoagulable o residual	0.100
Urea	0.30
Acidos aminados	0.08
Amoníaco	0.02
Creatina, creatinina	0.06
Acido úrico	0.03
Purinas	0.03

Pigmentos biliares (bilirrubina)
Lipocroma.

Fosfato de Magnesio	}	5 g.
Cloruro de Sodio		
Fosfato de Calcio	}	4 g.
Cloruro de Potasio		
Carbonato de Sodio		

Para purificar y concentrar un suero se han propuesto varios métodos, desde el más simple que consiste en la eliminación exclusivamente del agua, aprovechando la diferencia en los puntos de congelación de los diferentes productos que integran la composición del suero, hasta el de digestión péptica que es el más moderno y que se utiliza actualmente en los laboratorios más adelantados en la elaboración de productos biológicos.

El primer fraccionamiento plasmático fue llevado a cabo en 1852 (2), al precipitar una proteína diluyendo el suero con agua.

En 1862 (2), se le dio el nombre de globulina, por creer que provenía de los glóbulos rojos.

En 1878 (2), se comprobó que la globulina, en esa forma una vez redisuelta, podía precipitar saturándola, con $MgSO_4$; y se consideró a esta proteína como sero globulina y la disuelta como sero albúmina.

En 1886 fue introducido (2) el método de precipitación por soluciones de $(NH_4)_2SO_4$; y en 1889 (2), siguiendo los estudios de PANUM Y SCHMIDT, comparó las fracciones obtenidas por ellos, comprobando que al separar las globulinas por dilución podían aún precipitarse por $(NH_4)_2SO_4$ a semisaturación. Se dio el nombre de eu-globulina a la fracción insoluble en agua destilada y pseudoglobulina a la fracción soluble.

Además del fraccionamiento con $(NH_4)_2SO_4$, se han propuesto otras sales como con el Na_2SO_4 y $NaCl$; variando las concentraciones como se indica en la tabla.

Otro de los métodos de purificación y concentración de sueros que se han estudiado detenidamente y que fueron de gran utilidad en su época, son el de purificación y concentración por electro-ósmosis, el de ultracentrifugación, el fraccionamiento proteínico usando alcoholes de diferente concentración y cambio de pH.

CONCENTRACION DE SALES POR PRECIPITACION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS, GRAMOS POR 100 ml. DE SOLUCION

La capacidad de precipitación relativa, de ciertas sales cuando son aplicadas a suero o plasma sanguíneo y la influencia del catión en la precipitación de proteínas (16).

SAL	FIBRINOGENO	GLOBULINAS	PSEUDOGLOB. 1	PSEUDOGLOB. 2
Na_2SO_4	Mols 0.75	1.00	1.25	1.50
	15.6	14.2	17.7	21.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.25	1.50	1.75	2.00
	16.5	19.8	23.1	26.4
	Saturación (31.2 %)	(37.5 %)	(43.7 %)	(50.0 %)
	3.75	5.00		
NaCl	22.0	29.3		
	Saturación (75%)	(100%)		

SOLUBILIDAD DE

Na_2SO_4

20°C 16.39 g. se disuelven en 100 ml. de H_2O
 35°C 33.49 g. se disuelven en 100 ml. de H_2O

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20°C 75.49 g. se disuelven en 100 ml. de H_2O
 20°C sol. saturada contiene 52.8% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

NaCl

20°C 36 g se disuelven en 100 ml. de H_2O
 20°C Sol. saturada cerca del 29.3% de NaCl

En el plasma se encuentran tres proteínas o mejor dicho, tres grupos de proteínas fundamentalmente: albúmina, globulina y fibri

nógeno. Junto a estas tres, la cantidad mínima de núcleo proteico tiene escaso valor. La proporción de proteínas en el plasma es de 6 a 8 gramos por 100 ml. con una cifra media de 7.1.

Pero no todas las proteínas tienen la misma concentración. Así la fracción albúmina lo está a una concentración de 3.4 a 4.1%; las globulinas, 2.7 a 4% y el fibrinógeno, a 0.27%. Si se comparan las concentraciones parciales se puede colegir que la cantidad de globulinas es diez veces mayor que la de fibrinógeno, y la de albúminas, quince veces mayor.

ALBUMINA

La albúmina es una proteína sencilla, coagulable por el calor, soluble en agua y en soluciones salinas diluídas y precipitable por sales neutras en disolventes orgánicos. Es la proteína plasmática más simétrica, carácter de importancia, por no aumentar excesivamente la viscosidad al aumentar el poder oncótico.

Representa del 50 al 60% de las proteínas plasmáticas, soliendo ser el cociente albúmina-globulina de 1.72. Este predominio de las albúminas sobre las globulinas no ocurre en todas las especies animales. Por ejemplo, en el caballo el cociente es menor de la unidad. Asimismo disminuye el cociente en el hombre, en la mayor parte de los estados patológicos inflamatorios por aumento de la globulina gamma, y hepatocirrosis por aumento de globulina y disminución de albúmina.

La cifra media del peso molecular de la albúmina es de 69,000, su presión osmótica de 305 mm. de agua y la presión osmótica de Mercurio es de 5.5 mg. por gramo.

Hallando cifras totales se obtendrá que el hombre adulto posee en su plasma 125 g. de albúmina que ejerce una presión osmótica de 687.5; por todo ello bien puede deducirse que la albúmina es el componente más importante de la presión osmótica de la sangre, puesto que es responsable del 80% de dicha presión.

GLOBULINA

100 ml. del plasma contienen 2.7 g. de globulina. Teniendo en cuenta el valor total del plasma en un hombre adulto, éste posee de

80 a 83 ml. de globulina en circulación. El peso molecular de la globulina oscila entre 150.000 a 190.000 con una cifra media de 160.000. La presión osmótica de esta fracción proteica es de 56 mm. de agua. Puesto que cada gramo sólo tiene una presión osmótica de 18.9 índice muchísimo menor que el de la albúmina (74.4), debido al mayor peso molecular de la globulina. De esta forma la presión osmótica que ejerce la globulina, en 100 ml. de plasma es de 3.7 mm. de Hg con una presión osmótica total de 111 mm. de Hg. Químicamente las globulinas son sustancias ligeramente ácidas; se separan por las sales neutras, tienen menos azufre que las albúminas.

Sin embargo, la insolubilidad en agua y en soluciones salinas diluidas es la propiedad más importante de las globulinas, diferenciado de la albúmina, como posteriormente se señalará.

FIBRINOGENO

Es el menor componente proteico plasmático, con un peso molecular de 500.000, constituyendo únicamente, el 4% de las proteínas sanguíneas. Es la proteína menos soluble, coagulable a 56°C y precipitable añadiendo una solución saturada de cloruro sódico. Se transforma en fibrina en el acto de la coagulación al actuar sobre él la trombina. Esta transformación del fibrinógeno en fibrina no se efectuaría directamente según demostraron los trabajos realizados. Según dichos trabajos, el fibrinógeno o fibrinógeno "A", se transformaría gracias al componente "A" de la fibrina en el llamado fibrinógeno "B", sin los grupos azufrados originales. Sería sobre este fibrinógeno sobre el que actuando el componente "B" de la fibrina se transformaría en profibrina y en fibrina después.

El fibrinógeno baja corrientemente en las enfermedades que se asocian con leucocitosis prolongada y, en general, en todas las que hay una destrucción proteica.

Dejando a un lado el fibrinógeno y concentrando la atención en albúminas y globulinas, se ve que su diferencia fundamental es el comportamiento de dichas sustancias con los disolventes; así, mientras que la albúmina es soluble en agua destilada, las globulinas únicamente se disuelven en soluciones de sales neutras.

En este distinto comportamiento se basa la separación de albúminas y globulinas, mediante un dializador. Si en él se introduce el plasma o el suero y se renueva el agua de la cubeta donde está el dializador sumergido, hasta conseguir la total salida de sales plasmáticas a través de la membrana dializadora, sucederá que en una determinada concentración salina las globulinas se precipitan, mientras que las albúminas por su solubilidad en agua destilada permanecerán en suspensión coloidal. Así pues, la diálisis es un medio de separación de los componentes plasmáticos.

Más frecuentemente que la diálisis suele emplearse para la separación albúmino-globulina la electro-diálisis. Para ello se coloca el suero en un dializador cuyas membranas semipermeables sean laterales y opuestas entre sí. Mediante una corriente continua se efectúa el traslado de los electrolitos por la atracción de los polos eléctricos introducidos en la cubeta electrolítica.

Las sustancias albuminoideas requieren una considerable cantidad de agua para poderse mantener en disolución. Esta agua que toma la molécula albuminoide es la denominada agua de hidratación. Ahora bien, la cantidad de agua de hidratación que el péptido necesita está en estrecha relación con el pH del medio.

El péptido es una sustancia anfótera por la existencia en su molécula de grupos con carácter ácido y de otros con básico. A un determinado pH y de acuerdo con la ley de masas, el péptido será neutro, es decir desprenderá tantos grupos oxhidrilos como hidrogeniones. En ese pH denominado corrientemente punto isoeléctrico de la proteína, la aptencia de la sustancia, por el agua será mínima, y siendo ella necesaria para la suspensión coloidal dado el carácter de coloides liófilos que tienen las proteínas plasmáticas hasta el punto que poseen más bien propiedades de las emulsiones, la globulina precipitará mientras que la albúmina, aunque no llegue a hacerlo, se encuentra en el punto de equilibrio más inestable.

El mismo fundamento de la hidrofilia de las proteínas tiene la precipitación con sales neutras. Para precipitar tanto las albúminas como las globulinas, la cantidad de sulfato amónico precisa tiene que ser mayor que para precipitar una suspensión de coloides liófilos.

La explicación está en que el agua de hidratación que se encuentra rodeando la molécula proteica defiende a la proteína contra la acción de la sal. En realidad, los iones y las partículas proteicas lo que hacen es disputarse la posesión de agua de hidratación y precipita en copos grandes.

No todas las proteínas precipitan a idéntica concentración de sulfato amónico; mientras que las globulinas son fácilmente deshidratadas, puesto que tienen también menos cantidad de agua de hidratación; las albúminas no precipitan con soluciones semisaturadas, sino que es preciso para despojarlas de su gran cantidad de agua de hidratación, una solución saturada de sal.

Esta fuerza de retención del agua por parte de las moléculas albuminoideas es causante de la presión osmótica y de la viscosidad. Ambas están en relación con la hidratación y, por lo tanto, serán menores ambas en el punto isoelectrico.

FRACCIONAMIENTO PROTEICO DEL PLASMA

Que el plasma o el suero es un sistema complejo constituido por diversas clases de albúminas, es conocimiento antiguo. Sin embargo, en los últimos diez años los conocimientos de las fracciones proteicas del plasma han adquirido relieve insospechado. Los descubrimientos de TISELIUS, SVEDBERG y COHN, junto con los trabajos de sus colaboradores, han puesto en marcha las investigaciones de proteínas plasmáticas que serán de dominio público mediante las técnicas simplificadas (MILLER).

FRACCIONAMIENTO POR SULFATO AMONICO

Este método de fraccionamiento proteico fue descubierto por PUTNAM en 1852. Las globulinas, insolubles en agua pero sin embargo solubles en soluciones salinas diluidas precipitan mediante la adición a la suspensión coloidal de una cierta cantidad de sulfato amónico. Las albúminas también precipitan con el sulfato amónico. Ahora bien, mientras las globulinas lo hacen con soluciones semisaturadas de sulfato porque su cantidad de agua de hidratación es pequeña, y dicha cantidad de sal es suficiente para que produzca la

floculación en grandes copos; no sucede lo mismo con las albúminas, con mayor cantidad de agua de hidratación, puesto que son más liófilas, por lo que sólo precipitan con soluciones saturadas de sales neutras.

Este método es el más frecuentemente empleado para la separación de proteínas séricas, junto con sus variantes de precipitación con sulfato sódico y fosfato sódico y potásico. Para determinar los límites de concentración de sulfato amónico en que precipitan las proteínas descubiertas electroforéticamente se añaden cantidades variantes de solución salina, por lo que habrá de ser repuesta en las continuas determinaciones a fin de que la concentración sea idéntica.

En experimentos llevados a cabo por COHN, Mc MEEKIN y colaboradores, el suero se diluye en dos veces su valor, puesto que se ha demostrado claramente que la separación es mayor si las proteínas se encuentran más diluidas de lo que están en el suero. Las experiencias se han hecho a temperaturas de 0 a 25°C.

En caballos se ha demostrado que de 72 g. por litro de proteína se precipitan 11 a una solución tercio-saturada de sulfato amónico, la concentración tan frecuentemente empleada en los estudios inmunológicos.

Este precipitado parece constar casi completamente de globulina gamma. Estudiando electroforéticamente esta fracción precipitada, se puede comprobar lo mencionado, pero se ve además que una porción proteica que tiene al menos idéntica movilidad que la gamma-globulina no ha sido precipitada. Esta parte precipita, en cambio, con una solución de sulfato 0.34-0.40 saturada, aunque precipitando con ella componentes de otras fracciones globulínicas.

La fracción proteica que se precipita con una solución 0.40-0.50 saturada está ya totalmente libre de gamma-globulina y consta fundamentalmente de alfa y beta-globulina; las acompañan unos ligeros indicios de albúmina plasmática.

La solución 0.50-0.60 saturada de sulfato amónico precipita en el suero de caballo albúmina fundamentalmente, que precipita en cristales si la sal ha sido echada con cuidado. Esta porción o al menos las primeras partes del precipitado, están carentes de componen-

tes hidrocarbonados. Cuando la solución está cercana a la semisaturación, el análisis electroforético revela un predominio de las alfa-globulinas sobre las beta-globulinas, cambiando este predominio a medida que se acerca a la saturación 0.62-0.68.

Así pues, en el fraccionamiento por precipitación se ve que es posible ir más allá de la división de las proteínas plasmáticas en sus componentes de albúmina, globulina y fibrinógeno.

El fraccionamiento es algo más que un fenómeno de electroforesis y abre el camino a la purificación de las fracciones.

FRACCIONAMIENTO POR DIALISIS

Un método que complementa el fraccionamiento por sulfato amónico es el fraccionamiento por diálisis. Ya se ha señalado que mientras las albúminas son solubles en agua destilada, las globulinas únicamente lo son en soluciones salinas, como es el plasma. Pero si por un mecanismo como es el de la diálisis, o mejor aún el de la electrodiálisis, se separan los iones de la solución, mientras que las albúminas persisten en disolución (coloidal, se sobreentiende siempre), las globulinas flocularán.

Sin embargo, si se toma la fracción que ha precipitado con la solución 0.34-0.40 saturada de sulfato amónico y se dializa, sólo precipita aproximadamente un tercio de ella, aunque el espectro electroforético señale una ausencia casi total de albúmina. Por lo tanto, se tiene que convenir respecto a la existencia en esta fracción de dos tercios de pseudoglobulina y un tercio de euglobulina; el nombre de pseudoglobulina señala que esta clase de proteido no cumple una propiedad de las globulinas tan importante como es la insolubilidad hídrica. La técnica de este fraccionamiento es presumible. En otro lugar se ha mencionado los fundamentos de la electrodiálisis.

FRACCIONAMIENTO POR ULTRACENTRIFUGACION

Los problemas de ultracentrifugación han sido muy bien estudiados por SVEDBERG y expuestos por él y PEDERSEN en su monografía sobre "la ultracentrífuga" de 1940. Dicho autor, mediante la técnica de ultracentrifugación señala tres fracciones proteicas que se

dimentan a distintas revoluciones. Son una fracción albumínica y dos globulínicas. Las constantes de sedimentación para estas proteínas de suero animal son respectivamente de S_{20} por $10^{13} = 4.46, 7.1$ y 19.3 . Los cálculos de peso molecular que se deducen de estas constantes y de los estudios de difusión son de $70,000, 147,000$ y 910 . La primera fracción representa la albúmina, la segunda la globulina, mientras que la tercera es una fracción globulínica de gran importancia en inmunología.

Así pues, son las albúminas las que se desplazan más rápidamente, teniendo una velocidad decreciente las globulinas por orden de alfa a gamma, siendo la velocidad del fibrinógeno intermedia entre las beta sub-2 globulinas y la globulina gamma.

DIGESTION PEPSICA.

Fundamentalmente el método consiste en la eliminación de proteínas inertes para fines terapéuticos de los sueros sometidos a purificación, es decir la separación y eliminación de la alfa y beta globulina y de la albúmina y el aprovechamiento de la gamma globulina, que es la parte proteica a la que están unidos los anticuerpos, incluyendo la acción enzimática de la pepsina en medio ácido y a temperatura adecuada.

Las globulinas lábiles al calor son separadas por la acción de la enzima y precipitan por el calentamiento a 57-58°C en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El precipitado es removido por filtración y la globulina antitóxica en el filtrado es precipitada con una nueva adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este precipitado es separado por filtración, dializando después durante un corto período (3-4 días) para eliminar la mayor parte de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; el producto así obtenido sufre una nueva purificación por medio de un tratamiento de una solución de alumbre para eliminar las proteínas específicas. La globulina purificada es nuevamente precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el precipitado obtenido separado por filtración, el cual es prensado para eliminar exceso de humedad y algo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y nuevamente sometido a diálisis para la eliminación total del resto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para terminar, al dializado que contiene la parte activa del producto se le agrega 0.8% de NaCl, 0.3% de cresol como preservativo, y se ajusta a un pH de 7.2 con una solución de NaOH 2N.

El producto así obtenido es esterilizado a través de una bujía adecuada y envasado en envases apropiados de acuerdo con la poten-

cia del producto, el cual es sometido finalmente a pruebas de esterilidad, seguridad, potencia e identidad antes de ser lanzado al mercado.

El material y reactivos usados, así como el detalle de técnica y los resultados obtenidos se especifican a continuación:

El material indispensable para llevar a cabo este método, consta de una marmita de acero inoxidable con calefacción a vapor y agitación mecánica; un potenciómetro para ir tomando el pH en las distintas etapas del procedimiento; papel filtro Whatman No. 50 y papel filtro corriente; embudos de capacidad de 2 litros y garrafrones con capacidad para 20 litros; papel celofán para diálisis, cáñamo grueso; tijeras y termómetro de 100°C.

La materia prima será desde luego el suero que se vaya a concentrar y tomando en cuenta éste, el doble de volumen de agua.

REACTIVOS:

Suero fisiológico
Fenol
Acido Clorhídrico
Pepsina
Sosa
Tolueno
Sulfato de Amonio
Alumbre
Cloruro de Sodio
Cresol

TECNICA

- 1.—Plasma diftérico fenolado al 0.5% 20 litros.
- 2.—Suero fisiológico fenolado al 0.5% 40 litros.
- 3.—Mezclar el plasma con el suero fisiológico, por medio de agitación mecánica. (Tomar una muestra).
- 4.—Ajustar a pH de 3.6-4.0 con HCl sol. al 25%. Aproximada-

- mente 20 ml. de ácido por litro de suero diluido; agregar el ácido poco a poco agitando constantemente.
- 5.—Agregar pepsina 1:3000, 6 g. por litro de suero sin diluir, agitar hasta que la pepsina se disuelva. (Es mejor diluir la pepsina antes, en un poco de agua, para evitar que se formen grumos).
 - 6.—Ajustar a pH de 3.2 con HCl sol. al 25% (Aproximadamente 5 ml. por litro).
 - 7.—Calentar a 37°C. durante 1 hora. Agregar NaOH 2N hasta ajustar un pH de 4.2.
 - 8.—Agregar 110 g. de sulfato de amonio por cada litro de material digerido, agitando mecánicamente. (Continuar la agitación y ajustar con NaOH 2N a un pH de 4.3.) Tomar una muestra para verificación de potencia.
 - 9.—Agregar 1 ml. de tolueno por litro de plasma diluido.
 - 10.—Calentar rápidamente, agitando constantemente hasta alcanza: una temperatura de 55°C. (en 10 min.); conservar esa temperatura 1 hora, agitando de vez en cuando. Dejar enfriar gradualmente.
 - 11.—Filtrar en papel corriente y prensar el precipitado recogiendo el líquido. (Tomar una muestra para floculación, aproximadamente 20 ml.).
 - 12.—Ajustar el pH con NaOH 2N agitando constantemente, a pH de 7.6-7.8; agregar 260 g de sulfato de amonio por litro de solución, agitando hasta que se disuelva el sulfato; dejar una hora y filtrar por papel Whatman No. 50.
 - 13.—Secar el precipitado y dializar 3-4 días.
 - 14.—Medir agua destilada y fenolada al 0.5%. (Mitad del volumen del plasma diluido).
 - 15.—Medir el suero dializado y agregarlo al agua.
 - 16.—Agregar 80 ml. de una solución de alumbre al 10% por cada litro de suero diluido, agitando.
 - 17.—Cambiar el pH a 7.6-7.8 con NaOH 2N (aproximadamente 22 ml. por litro). Determinación en potenciómetro.

- 18.—Agitar una hora y dejar reposar dos horas; y filtrar con papel suave.
- 19.—Medir el filtrado y agregar un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio.
- 20.—Filtrar, secar y dializar exactamente igual que la segunda precipitación de los sueros. (Volumen a volumen). Método usual.
- 21.—Al dializar agregar 0.8% de NaCl; 0.3% de cresol y ajustar el pH a 7.2-7.4
- 22.—Tomar una muestra para la prueba de potencia.

EXPERIMENTACION.

En el presente trabajo se hizo un estudio experimental de un método para purificación por digestión péptica, de un suero diftérico, de un bothrópico y de un tetánico.

SUERO DIFTERICO

Volumen del plasma	20,000 ml.
Título	600 U.I
Agua destilada	40,000 ml.
NaCl 0.8%	320 g.
Fenol 0.5%	200 ml.
HCl para pH 3.8-4.0	1,200 ml.
Pepsina 10 g./litro (plasma sin diluir)	200 g.
HCl para pH de 3.2	280 ml.
Calentamiento a 37°C.	1 hora.
NaOH para pH 4.2	860 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ 11%	7,225 g.
Tolueno 0.1% plasma total	65 ml.
Calentamiento a 55°C.	1 hora.
Volumen filtrado	60,000 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	1,300 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ 26%	21,938 g.
Agitar y dejar reposar	1 hora.
1a. diálisis, tiempo	4 días.

Volumen 1a. diálisis	4,800 ml.
Agua fenolada al 5%	20,000 ml.
Volumen total	25,000 ml.
Alumbre al 10% (80 ml. litro)	2,000 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	625 ml.
Volumen filtrado	21,000 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ solución saturada (vol. a vol.)	21,000 ml.
2a. diálisis, tiempo	3 días.
Volumen 2a. diálisis	800 ml.
Título final	6,000 U.I.
Sólidos totales 2a. diálisis	11.1 g. %
Cresol (preservativo)	0.3%
pH final	7.2
Cleruro de Sodio al 0.5%	4 g.
Sulfatos	0.05 g. %

RESUMEN

Potencia del plasma crudo	600 U.I./ml
Potencia del plasma concentrado y purificado por di- gestión péptica	6000 U.I./ml.

Unidad de concentración) en volumen, 20 veces
) en potencia, 10 veces

SUERO BOTHIROPICO

Volumen del plasma	60,000 ml.
Título	40. 1/3 ₂ cent. 1 mg.
Agua destilada	120,000 ml.
NaCl 0.8%	900 g.
Fenol 0.5%	600 g.

HCl para pH 3.3-4.0	3,200 ml.
Pepsina 10 g. litro (plasma sin diluir)	600 g.
HCl para pH de 3.2	880 ml.
Calentamiento a 37°C	1 hora.
NaOH para pH 4.2	2,100 ml. -
(NH ₄) ₂ SO ₄ 31%	20,655 g.
Tolueno 0.1% plasma total	190 ml.
Calentamiento a 55°C	1 hora.
Volumen filtrado	175,000 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	4,200 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ 26%	46,800 ml.
Agitar y dejar reposar	1 hora.
1a. diálisis, tiempo	3 días.
Volumen 1a. diálisis	6,000 ml.
Agua fenolada al 5%	65,000 ml.
Volumen total	75,000 ml.
Alumbre al 10% (80 ml./litro)	6,000 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	1,430 ml.
Volumen filtrado	75,000 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ solución saturada (vol. a vol.)	75,000 ml.
2a. diálisis, tiempo	4 días
Volumen 2a. diálisis	2,200 ml.
Título final	25 mg./ml.
Sólidos totales 2a. diálisis	12.6 g. %
Cresol (preservativo)	0.3 %
pH final	7.2
Cloruro de Sodio al 0.5%	11 g.
Sulfatos	0.04 %

RESUMEN

Potencia del plasma crudo, neutraliza 3 mg. de ponzoña/ml.
 Potencia del plasma concentrado y purificado por digestión péptica,
 neutraliza 25 mg. de ponzoña/ml.

Unidad de concentración	}	en volumen, 27 veces en potencia, 8.3 veces
-------------------------	---	--

SUERO TETANICO

Volumen del plasma	60,000 ml.
Título	360 U.I.
Agua destilada	120,000 ml.
NaCl 0.8%	960 g.
Fenol 0.5%	600 g.
HCl para pH 3.8-4.0	4,500 ml.
Pepsina 10 g. litro (plasma sin diluir)	600 g.
HCl para pH de 3.2	1,400 ml.
Calentamiento a 37°C	1 hora.
NaOH para pH 4.2	2,500 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ 11%	20,800 g.
Tolueno 0.1% (volumen total)	190 ml.
Calentamiento a 55°C	1 hora.
Volumen filtrado	181,200 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	4,300 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ 26%	18,230 g.
Agitar y dejar reposar	1 hora.
la, diálisis, tiempo	48 hs.
Volumen la, diálisis	7,400 ml.
Agua fenolada al 5%	65,000 ml.
Volumen total	75,000 ml.

Alumbre al 10% (80 ml. litro)	6,000 ml.
NaOH 2N para pH 7.6-7.8	1,700 ml.
Volumen filtrado	80,000 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄ solución saturada (vol. a vol.)	80,000 ml.
2a. diálisis, tiempo	48 hs.
Volumen 2a. diálisis	1,800 ml.
Título final	1,300 U.I.
Sólidos totales 2a. diálisis	12.65 g. %
Cresol (preservativo)	0.3 %
pH final	7.4
Cloruro de Sodio al 0.5%	9 g.
Sulfatos	0.04 g. %

RESUMEN

Potencia del plasma crudo	360 U.I.
Potencia del plasma concentrado y purificado por di- gestión péptica	4,300 U.I.

Unidad de concentración } en volumen, 33 veces
en potencia, 12 veces

ESTUDIOS DIFERENCIALES POR ELECTROFORESIS.

Siendo la electroforesis un método muy preciso para diferenciar las diferentes proteínas de un suero, así como para su determinación, es relativamente fácil hacer estudios diferenciales de los sueros.

Estos estudios pueden ser de dos clases:

1o.—Estudios diferenciales de las proteínas de un suero terapéutico, para conocer el grado de purificación de este producto.

2o.—Estudios diferenciales de las proteínas de un suero de una persona enferma para efectuar su diagnóstico.

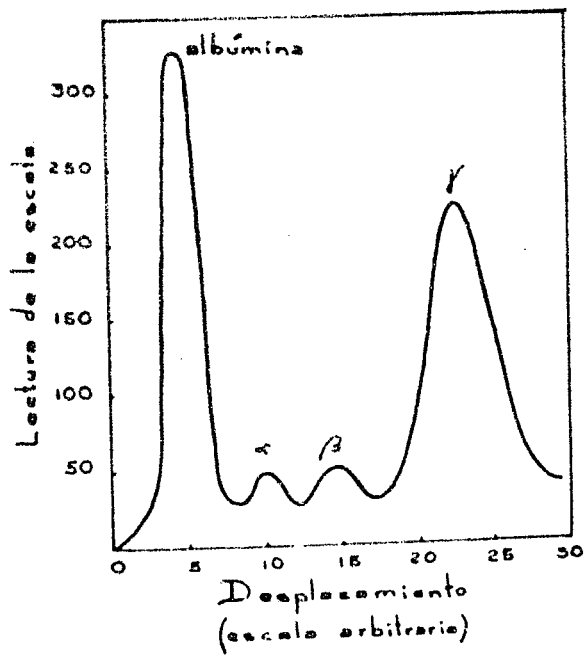
Se hará mención únicamente del 1er. punto que es el que está ligado al desarrollo de la presente tesis, pues el segundo es un tema de interés netamente médico.

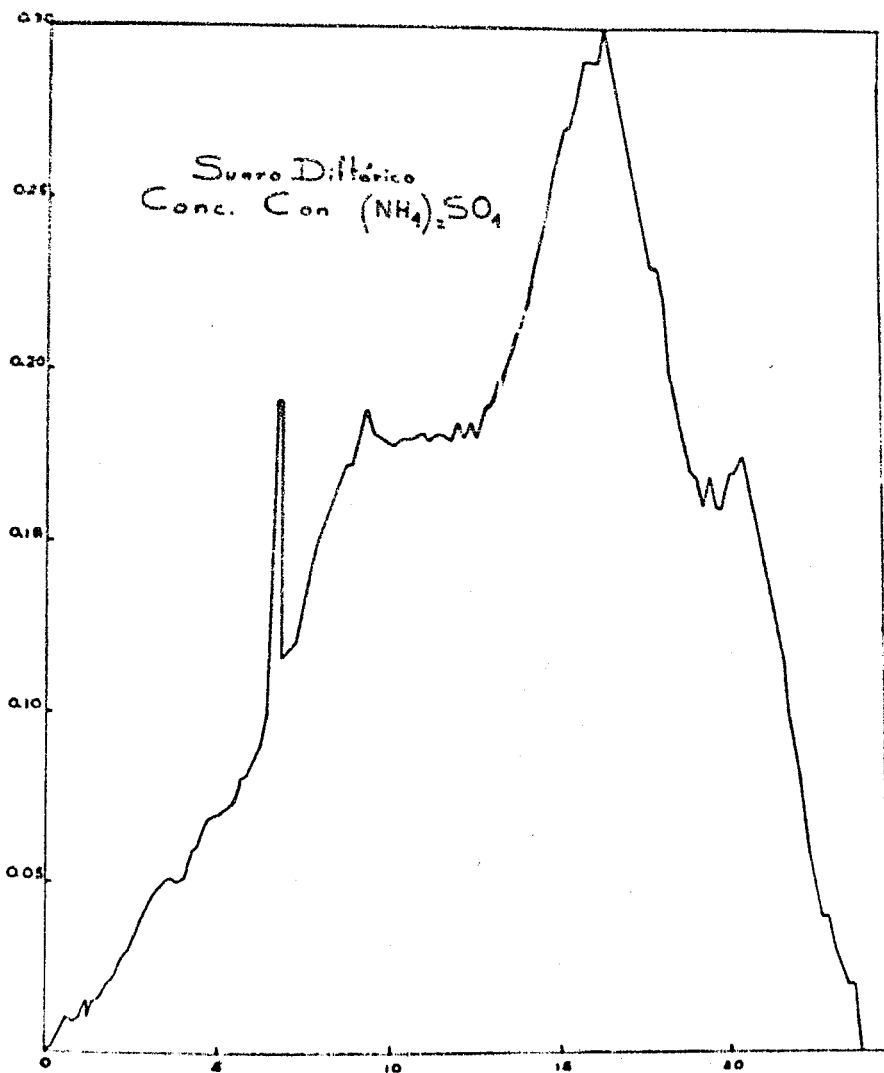
Es bien sabido que la fracción activa de un suero terapéutico es la gamma globulina, es decir, los anticuerpos producidos por la inmunización activa de un animal está unidos a la fracción antes mencionada.

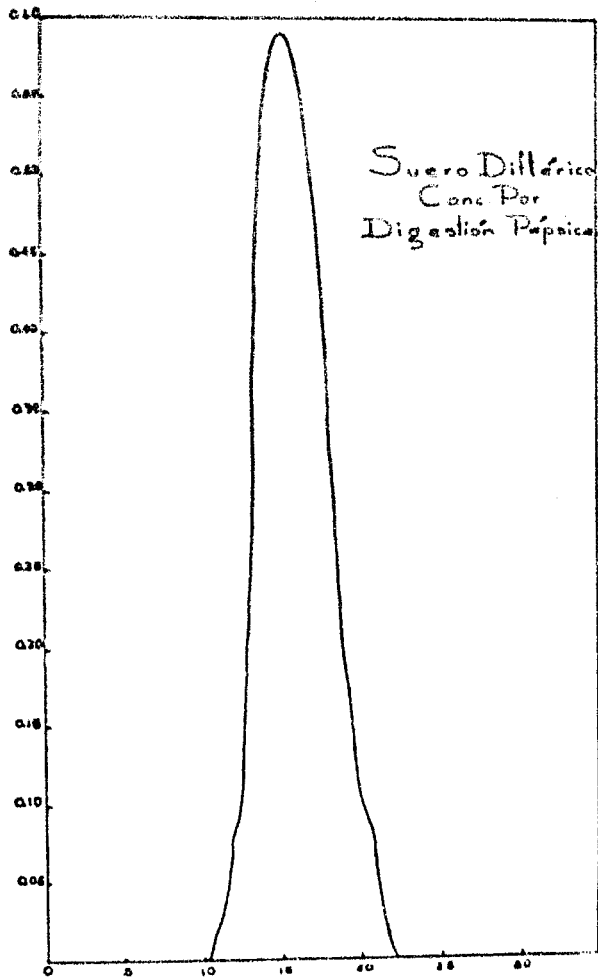
Por los diferentes métodos de concentración de sueros que se han enunciado en esta tesis y por los estudios electroforéticos efectuados en los productos finales, se ve perfectamente, de acuerdo con las gráficas adjuntas, que el método de concentración por digestión péptica, es el mejor, pues el producto terminado consta exclusivamente de gamma globulina; en cambio los productos obtenidos por otros métodos de concentración, están impurificados con proteínas inertes, que lo único que originan al ser aplicadas al paciente es una sensibilidad a dichas proteínas.

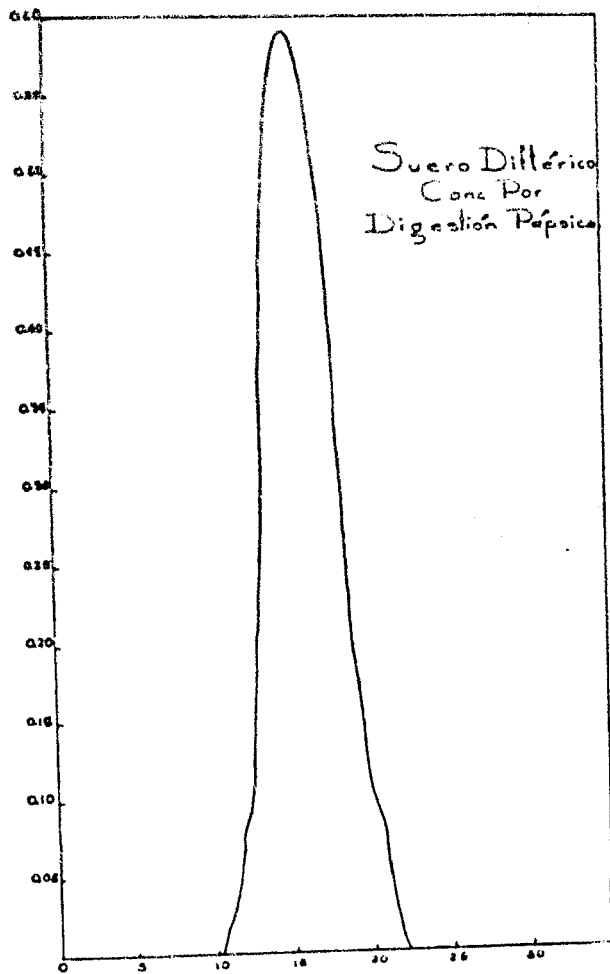
La electroforesis se puede utilizar también en los pasos intermedios de concentración de sueros para darse cuenta de la eliminación de proteínas inertes y conocer si el porcentaje del agente precipitante de las proteínas ha sido correcto.

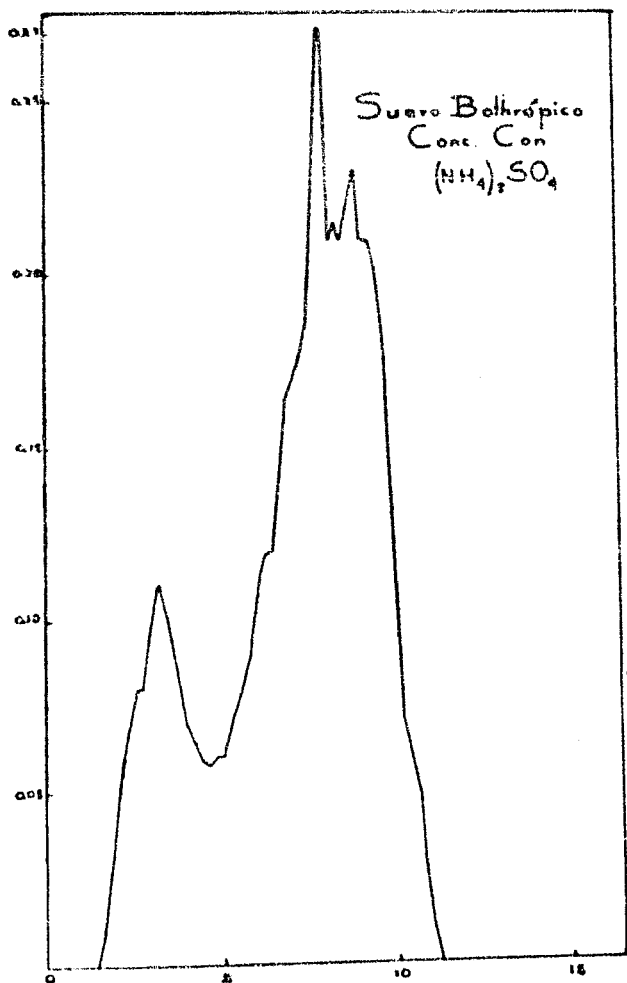
Suero Normal.

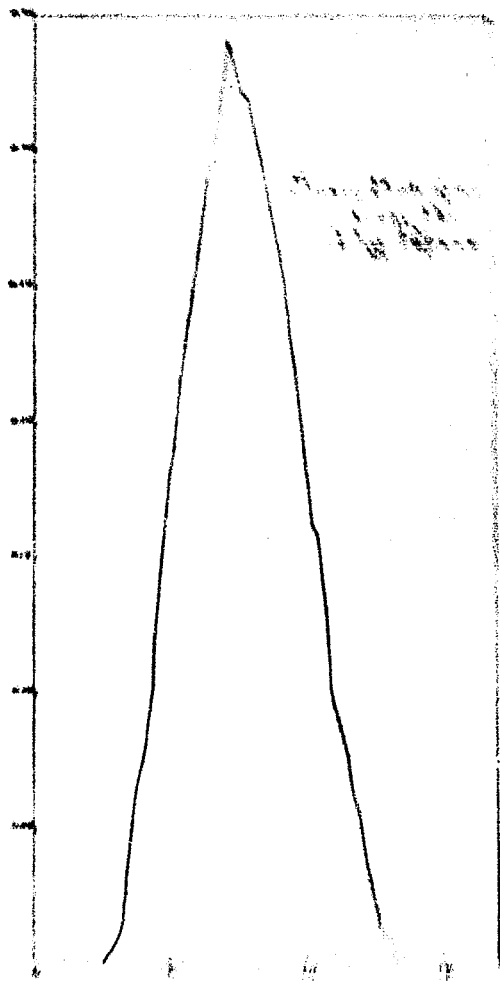


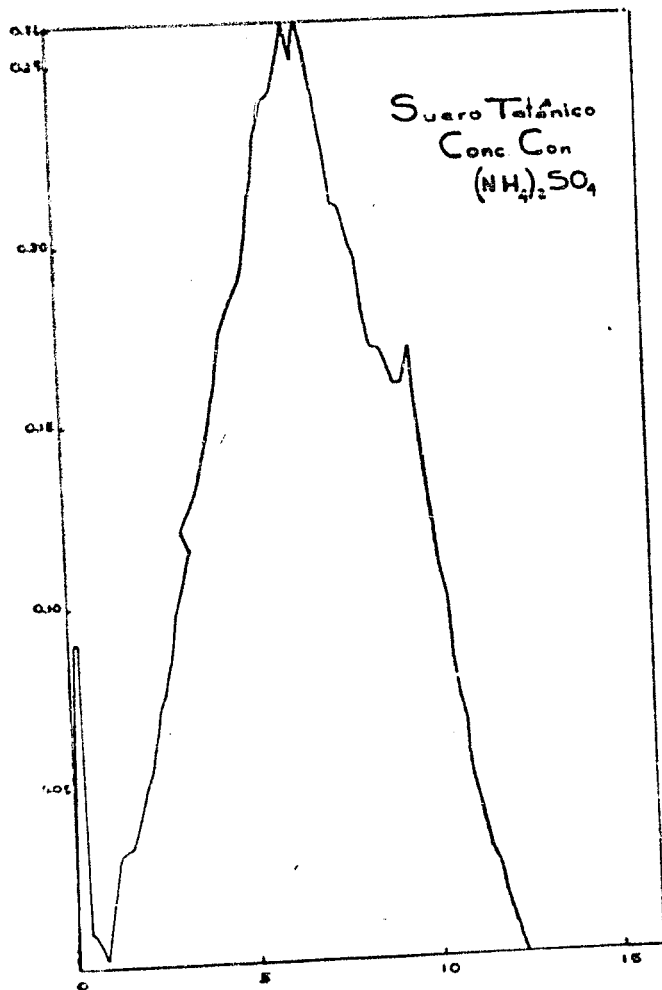




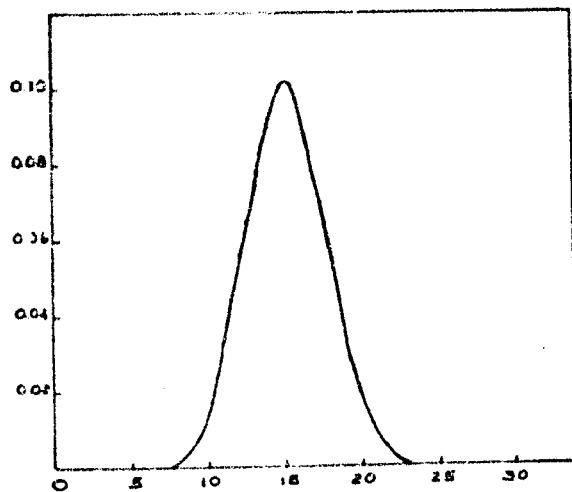








Suero Tetánico
Conc. Por Dig Pepsica.



CONCLUSIONES.

- 1o.—Se hacen estudios comparativos de los diferentes métodos de concentración de sueros.
- 2o.—El estudio comparativo de estos métodos, se complementó con la electroforesis.
- 3o.—El método de digestión péptica, que es el tema principal de esta tesis, es el que resulta mejor, pues únicamente consta de la fracción gamma globulina, que es la fracción a la que están unidos los anticuerpos de los sueros terapéuticos.
- 4o.—El producto obtenido por el método de digestión péptica produce menos reacciones que los productos obtenidos por otros métodos de concentración.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Abramso, H. A., E.J.B.D. Davis, F.L. Horsfall, L. G. Longworth, D.A. Mac. Innes, H. Mueller y K.G. Stern, Electrophoresis. *Ann. New York Acad. Sci.*, 105-112 (1939).
- 2.—Aguayo de la Peño Manuel, "Nuevo Tipo de Meningococo y Concentración de Sueros", Escuela Nacional de Ciencias Químicas, México (1931).
- 3.—Acids and bases in organic chemistry, Davidson, *ibid.*, 18, 154 (1941).
- 4.—Blas, L. "Agenda del Químico". Aguilar, Madrid. 640-653 (1942).
- 5.—Boletín Técnico de la Dirección General de Sanidad, Año XXVII; Julio, Agosto, Núms. 7 y 8 (1953).
- 6.—Carpenter Ph., "Immunology and Serology" (1956).
- 7.—Cohn, J.E.W.L. Hughes Jr. y J.H. Weare. "Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIII. Crystallization of Serum Albumins from Ethanol-Water-Mixtures. *J.Am.Chem. Soc.*, 69 (7): 1753-1761 (1947).
- 8.—Cohn, J.E. y J.T. Edsall, "Proteins, Amino Acids and Peptides", Rheinhold, New York, págs. 575 y siguientes (1943).
- 9.—Cohn, J.E. "Studies in the Physical Chemistry of proteins". I.—The Solubility of Certain Proteins at their Isoelectric Point *J. Gen. Physiol.*, 4(6): 619-622 (1922).

- 10.—Getman y Daniels, "Tratado Moderno de Físico Química", págs. 230-271, Editorial Continental, S.A., México (1955).
- 11.—Interpretation of pH, Gorman, *ibid.*, 17, 313 (1940).
- 12.—Lederer M., "An introduction to Paper electrophoresis and related methods", págs. 95-115, Elsevier publishing company, Amsterdam-Houston-London, New York (1955).
- 13.—Mendola G.J., *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, "El Uso de Resinas de Intercambio iónico en fraccionamiento de Plasma Normal Humano", México (1956).
- 14.—Milan B., "Electrophoresis, Theory, Methods, ad Applications.", Fordham University, New York and Institute of Applied Biology, Inc., New York (1959).
- 15.—Modern conception of acids and bases, Hall, *Journal of Chemical Education*, 7, 782 (1939).
- 16.—Paul E. Howe, 57, 1,241-51 (1923).
- 17.—Remy H., *Treatise on Inorganic Chemistry* (1956).
- 18.—Svedberg y Pedersen, "The Ultracentrifuge", Oxford University Press, Oxford (1940).