

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

# EXTRACTOS ALERGENICOS

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

AMERICA SACA

EN EL ACTO DE SU DOCTORAMIENTO PUBLICO

1960

SAN SALVADOR



EL SALVADOR

†  
616.97  
S1191  
1960  
F. cc. QQ  
aj. 2

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10124914

049904

*UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR*

*Rector*

*Dr. Napoleón Rodríguez Ruiz*

*Secretario*

*Dr. Roberto Emilio Cuéllar Milla*

*FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA*

*Decano*

*Dr. Francisco González Suvillaga*

*Secretario*

*Dr. Roberto A. Machado*

J U R A D O S

PRIMER EXAMEN DE DOCTORAMIENTO PRIVADO

*Dr. Manuel Salinas Ariz*  
*Dr. Luis Arístides Amaya*  
*Dr. Raúl Montoya*

SEGUNDO EXAMEN DE DOCTORAMIENTO PRIVADO

*Dr. Elías Alvarado Cornejo*  
*Dr. Francisco González Suvillaga*  
*Dr. Francisco Hernández Roque*

DOCTORAMIENTO PUBLICO

*Dr. Manuel Salinas Ariz*  
*Dr. Carlos Mata Gavidia*  
*Dr. César Morán Ramírez*

o o o

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

o o o o

DECANATO

REPUBLICA DE EL SALVADOR, C. A.

o o

Nosotros, los abajo firmantes, Presidente y Vocales que integramos el TRIBUNAL DE DOCTORAMIENTO PUBLICO, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, nos hemos reunido en el Decanato de dicha Facultad, a fin de dictaminar sobre la Tesis presentada por la Bachiller América Saca e intitulada *EXTRACTOS ALERGENICOS*. Y encontrando que dicha Tesis reúne los requisitos exigidos por el Artículo 190 de los Estatutos Universitarios vigentes, la aprobamos por unanimidad de votos.

En fe de lo cual firmamos la presente, en la ciudad de San Salvador, a los dos días del mes de Mayo de mil novecientos sesenta.

Dr. Manuel Salinas Ariz

Presidente

Dr. Carlos Mata Gavidia

Vocal

Dr. César Morán Ramírez

Vocal

*DEDICATORIA*

*A mi querido e inolvidable Padre:  
Juan Saca*

*A mi querida Madre:  
Matilde Afife v. de Saca*

*A mis hermanos:  
Jorge Marcelo, Juan Oliverio y María*

*A mis Tíos*

*A mis Profesores*

*A mis Amigos y Compañeros*

EXTRACTOS ALERGENICOS

o o o

1. INTRODUCCION
2. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ALERGENICOS
3. CONSERVACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS
4. METODOS ESPECIFICOS DE PREPARACION
5. CONSIDERACIONES GENERALES
6. BIBLIOGRAFIA

o o o

PARA EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS ME HE AUXILIADO  
DEL DR. JORGE MARCELO SACA.

## INTRODUCCION

Soluciones alérgicas son extractos o preparaciones de varias sustancias a las cuales los individuos pueden volverse sensitivos.

Estas soluciones pueden usarse ya para diagnóstico, como para tratamiento o desensibilización.

El término *alergia* puede definirse como una hipersensibilidad específica de los seres humanos a cualquier agente. Este puede ser un alimento, un polen, un hongo, el pelo o la caspa de varios animales domésticos, también pueden ser ciertas gomas como *acaraya* o *acacia* las cuales son muy usadas en cosméticos; puede ser una sensibilidad específica a varios insectos tales como *moscas de Mayo* o *mosquitos*; puede deberse también a plumas o algodón usados en la manufactura de *almohadas*. Las posibilidades de una sensibilidad específica prácticamente no tiene límites. Hemos mencionado únicamente unas de las más comunes. La hipersensibilidad se manifiesta en el paciente de varias formas. Puede afectar su *nariz*, en tal caso se encuentra la membrana mucosa inflamada e irritada, entonces se dice que el paciente tiene *fiebre del heno*, *rinitis alérgica*, también alcanza los ojos que se vuelven edematosos irritados y con escozor. Si afecta sus pulmones o bronquios se dice que tiene *asma bronquial*. En estas condiciones los bronquios del paciente se vuelven contraídos y edematosos, la respiración extremadamente difícil y emite un ruido peculiar o característico. Si el sistema nervioso central es afectado, uno de los efectos más comunes es la *micrania*. Otras manifestaciones alérgicas son *urticaria* y *edema de la piel*, *úlceras* en el tracto gastro intestinal, *irritabilidad de las vías urinarias* y ciertos tipos de *artritis*.

Como podemos ver las manifestaciones alérgicas son muy diversas, pero las más comunes son las que se refieren a la *nariz*, *bronquios*, *piel* y *sistema nervioso central*.

La sensibilidad del paciente puede ser probada en varias formas, usando extractos preparados con sustancias, las cuales comúnmente producen hipersensibilidad.

El *Ensayo de escara* es el que usualmente se hace primero, que las reacciones constitucionales a éstos son mínimas. Una serie de pequeñas *escaras* o *abrasiones circulares* son hechas en varias hileras hacia abajo en la espalda del paciente, después una pequeña cantidad de extracto preparado especialmente es puesto en cada escara, usando diferente extracto en cada abrasión. Después de dejarlo allí por veinte a treinta minutos el resultado es leído. Una reacción positiva es manifestada por una *drea rojiza inflamada* en el punto donde el material fue aplicado. El grado de reacción es indicado de acuerdo con la apariencia del *drea* ensayada. El *ensayo intercutáneo e intradérmico* es hecho inyectando una pequeña cantidad de dilución del extracto en las capas de la piel y observando la reacción.

La sensibilidad del paciente puede ser también provocada por medio del *ensayo del parche*. El material sospechoso es puesto en la piel y cubierto con un pedazo de *papel celofán*, el cual se fija por medio de una tira de *esparadrapo*. La reacción es leída...

Los que se sospeche una dermatitis de contacto. Entre otras formas de ensayo se encuentra el oftálmico, en el cual unas gotas de material o extracto es puesto en el saco conjuntival y después de unos pocos minutos la reacción es leída, la cual se manifiesta por enrojecimiento, picazón y lagrimeo. El ensayo nasal se lleva a cabo en forma similar.

La interpretación de estos ensayos junto con la historia del paciente, la cual es igual o de mayor importancia, son las bases del tratamiento a prescribir.

Si el paciente es sensitivo a alimentos o a otras cosas las cuales pueden ser fácilmente eliminadas, usualmente se recomienda que evite el contacto con ellas. Si es sensible al polen, al pelo o al pelo de animales, el paciente puede recibir una serie de tratamientos de desensibilización.

### PREPARACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS

La preparación de extractos alérgicos presenta ciertas operaciones fundamentales, las cuales pueden agruparse bajo los siguientes títulos:

División	clarificación	esterilización
desengrasamiento	diálisis	ensayo de estabilidad
extracción	concentración	estandarización

El procedimiento a seguir en la preparación de los diferentes extractos varía con la naturaleza de la sustancia ya sea por su contenido en grasa, humedad o contenido de impurezas y por el uso que se hará del extracto final, ya sea para ensayo de escara o intracutáneo. No todas las sustancias están sujetas a cada uno de los procedimientos que se detallarán. Por ejemplo, materiales libres de grasa, no serán desengrasados, ni sustancias que están finamente divididas no serán trituradas, solamente unas pocas preparaciones requieren diálisis, etc.

#### DIVISION

El propósito de moler o triturar el material es una mejor división de las membranas celulares y aumentar el área total de la superficie para su extracción. Una eficiente extracción depende en gran parte del estado de subdivisión. Tres métodos generalmente pueden ser usados para obtener la sustancia en un estado final de división. Aquellos materiales los cuales contienen una pequeña cantidad de humedad pueden ser fácilmente triturados por un mezclador eléctrico. Los materiales deben ser puestos en la mezcladora eléctrica, en estado seco, pues la adición de agua causaría una emulsión especialmente con aquellas sustancias que tienen un alto contenido en grasas. Los materiales que pueden ser divididos o triturados en esta máquina incluyen granos de cereales, nueces, semillas de lino, semillas de algodón.

Alimentos conteniendo una gran cantidad de humedad pueden ser



El tercer método de división es cortando por medio de una tijera. Esta es la única forma por la cual ciertos tipos de sustancias pueden ser puestos en estado de fina subdivisión. Los materiales que se cortan con tijeras incluyen pelo de animales, plumas algodón y sedas.

## DESENGRASAMIENTO

Ciertas sustancias alergénicas son primero desengrasadas para que los principios solubles en agua sean más rápidamente extraídos por los disolventes acuosos.

Además sirve el desengrasado para prevenir la emulsificación durante el proceso de extracción y hacer posible la producción de extractos claros a través de la eliminación de sustancias oleosas las cuales tienden a producir turbidez en el producto final. Todos los pólenes por ejemplo deben ser desengrasados.

El agente comunmente usado para el desengrasamiento, es el éter, sin embargo otros disolventes orgánicos como tolueno, xilol, son empleados algunas veces, especialmente con materiales que contienen grandes cantidades de resinas, aceites y ceras. El procedimiento de desengrasado debe ser llevado a cabo a temperatura ambiente con las precauciones necesarias empleadas con los solventes orgánicos que evitan la producción de llamas o chispas.

Los materiales que son desechos en el mezclador pueden ser desengrasados agregando suficiente éter hasta cubrir el material, agitando el contenido por varios minutos, dejando el material que seque y decantando el líquido supernatante. Este proceso es repetido tres veces. Con algunas sustancias el proceso de desengrasamiento es llevado a cabo en un biker o por medio del uso de un embudo de separación.

Materiales conteniendo una gran cantidad de aceites volátiles irritantes, ceras y resinas los cuales requieren un proceso adicional para su eliminación incluyen café, té, cacao, semillas de algodón, pimienta, mostaza y jengibre. Estos materiales son lavados tres veces con tolueno, alcohol y éter con el objeto de remover las sustancias irritantes.

Después que las sucesivas extracciones con los solventes orgánicos han sido llevadas a cabo, el polen u otros materiales son secados al aire ambiente y puestos en un recipiente estéril para su conservación.

El extracto oleoso obtenido en el procedimiento de desengrasado de los pólenes, es frecuentemente usado en el ensayo de parches; diluciones en aceite de oliva o de cacahuete se usan para el tratamiento oral de ciertas dermatitis de contacto.

## EXTRACCION

El propósito de la extracción es remover la sustancia alergénica activa del material y ponerla en solución en el solvente. Se ha pensado que el principio activo pueden ser unas proteínas o polisacáridos solubles en agua. Ya que estas sustancias son rápidamente solubles en un medio alcalino una solución básica es generalmen

considerado óptimo para la extracción. Variedades de vehículos son usados para la extracción, esto incluye soluciones salinas buffereadas, glicerina en solución isotónica de cloruro de sodio, solución de bicarbonato de sodio y cloruro de sodio. Solución isotónica de dextrosa, solución de bicarbonato de sodio y de dextrosa una solución decimonormal de hidróxido de sodio o de hidróxido de potasio. Una solución isotónica de cloruro de sodio es satisfactoria para la extracción de polen pero las cualidades de conservación del extracto son muy pobres. Las soluciones buffereadas se prefieren para aquellas sustancias fuertemente ácidas o alcalinas tales como carnes y frutas para preservar su neutralidad y disminuir la irritabilidad del extracto. Ellas son también preferidas para la extracción de pelo de animales o de caspa.

Los fluidos extractantes conteniendo glicerina son los preferidos para uso general. Los extractos glicero-salinos poseen excelentes cualidades de conservación y guardan su potencia por muchos años. Sin embargo, la glicerina es muy irritante para ser usada en el ensayo intercutáneo y frecuentemente da falsas reacciones.

Esta desventaja es vencida usando la solución de glicerina para preparar un stock del concentrado el cual es después diluido con una solución amortiguada salina o solución salina bicarbonatada para uso intracutáneo. Muchas diferentes soluciones glicero salinas son usadas. Muchas de ellas contienen aproximadamente el 50% de glicerina. A ésta pueden ser agregadas soluciones de cloruro de sodio en varias concentraciones o cloruro de sodio con otras sales que sirven como amortiguadoras.

Una solución de cloruro de sodio y de bicarbonato de sodio, (coca) es muchas veces usada para extracto de polen y polvo. La presencia de bicarbonato de sodio ayuda a la extracción. Sin embargo, ya que las cualidades de conservación de estos extractos son pobres un fluido extractante glicero-salino es generalmente preferido. Los extractos hechos con solución coca pueden precipitar debido a la pérdida de  $\text{CO}_2$  de la solución. Este precipitado se puede redissolver burbujeando  $\text{CO}_2$  a través de la solución. También la filtración bajo presión causa pérdida de  $\text{CO}_2$  con la resultante precipitación. Esto puede ser evitado usando presión positiva en la filtración. Cuando la solución Coca es usada con frutas o jugos vegetales es preparada cinco veces más concentrada que lo usual. Una parte de esta solución concentrada es agregada a cuatro partes del jugo resultando una solución con la misma concentración que el extracto fluido original.

La solución de dextrosa al 5% es preferida por muchos farmacéuticos como fluido extractante ya que éste conserva el extracto en buenas cualidades y no causa dolor al ser inyectado. Sin embargo, sus propiedades conservadoras no son tan buenas como la de los extractos preparados con solución glicero-salina. La adición de pequeñas cantidades de bicarbonato de sodio a esta solución previene la precipitación de un glucósido lo cual frecuentemente ocurre después que los extractos han sido guardados por algún tiempo.

Hidróxido de sodio o de potasio 0.10 normal es usado especialmente cuando polvos secos se usan para el ensayo de escara. El

lina. Estos solventes pueden también ser usados para preparar extractos. Una solución de hidróxido de sodio 0.20 normal es usada frecuentemente para este propósito.

Ya que las soluciones alergénicas son envasadas en frascos viales de dosis múltiples, un agente bacteriostático es necesario para su conservación. Los agentes bacteriostáticos más comúnmente usados son: Fenol o cresol. Estos son usados en concentraciones de 0.4 a 0.5%. Sin embargo, cuando estos preservativos son usados en las soluciones amortiguadas salinas conteniendo fosfato como amortiguadores, da una solución nebulosa que se produce después de la esterilización al autoclave. Así cuando la solución fosfatada amortiguada es esterilizada por el calor, se recomienda usar una combinación de metil-parabeno 0.18% y propil parabeno 0.02%. Alternativamente la solución puede esterilizarse por filtración bacteriológica o el preservativo puede agregarse a la solución amortiguada después de esterilizarla al autoclave. Todo fluido extractante debe ser mantenido estéril y libre de pirógenos.

#### VEHICULOS EXTRACTANTES

Las soluciones básicas generalmente usadas para extracción son:

##### Solución Salina Amortiguada

Cloruro de Sodio	5.0	gramos
Bifosfato de Potasio	0.36	"
Fosfato de Sodio 12 H <sub>2</sub> O	1.43	"
Metyl-parabeno	1.80	"
Propyl-parabeno	0.20	"
Agua para inyección c. s. p.	1000.0	ml.

##### Solución Amortiguada Glicero-Salina Fosfatada

Glicerina	500.0	ml.
Fosfato de sodio 12 H <sub>2</sub> O	1.43	gramos
Cloruro de Sodio	5.0	"
Bifosfato de potasio	0.36	"
Fenol	5.0	"
Agua para inyecciones c. s. p.	1000.0	ml.

##### Solución Glicero-Salina

Glicerina	500.0	ml.
Cloruro de sodio	9.0	gramos
Fenol	4.0	"
Agua para inyección c. s. p.	1000.0	"

##### Solución Glicero-Salina Hipertónica (Solución Stier)

Glicerina	460.0	ml.
Cloruro de sodio	40.0	gramos
Agua para inyección c. s. p.	1000.0	ml.

Solución Salina de Bicarbonato  
(Solución Coca)

Cloruro de sodio	5.0	gramos
Bicarbonato de sodio	2.75	"
Fenol	4.0	"
Agua para inyección c. s. p.	1000.0	ml.

Solución Dextrosada

Dextrosa	50.0	gramos
Fenol	5.0	"
Agua para inyección c. s. p.	1000.0	ml.

Solución Dextrosada de Bicarbonato  
(Solución Unger)

Dextrosa	50.0	gramos
Fenol	5.0	"
Bicarbonato de sodio	27.0	"
Agua para inyecciones	1000.0	ml.

El solvente extractante seleccionado es agregado al material en la correcta proporción y la extracción es llevada a cabo en un recipiente cerrado y a temperatura ambiente por cuarenta y ocho a noventa y seis horas agitando ocasionalmente. Un frasco de boca ancha y cuadrada es adecuado.

Durante el proceso de extracción el frasco deberá estar perfectamente tapado y puesto acostado para que la superficie de exposición del material que se está extractando sea mayor.

La eficiencia del proceso de extracción es aumentada agítandolo en una máquina agitadora por varios períodos de 30 minutos durante el proceso de extracción.

Una pequeña cantidad de tolueno es agregada al material durante la extracción, para evitar el crecimiento bacteriano y la fermentación; usualmente 0.1% es suficiente.

Cuando el extracto finalmente va a ser concentrado para preparar el material para el ensayo de escara, el porcentaje de los ingredientes del solvente debe ser reducido en tal manera que la solución quede isotónica después de concentrada o sino la concentración final de las sales y preservativos será muy alta. Por ej. si el líquido extractante contiene 0.5% de cloruro de sodio, 0.275% de bicarbonato de sodio y 0.4% de fenol y el extractante es concentrado diez veces más evaporando el solvente, el líquido extractivo debe ser diluido diez veces, antes de añadido al material, de otro modo la concentración final de cloruro de sodio sería 5%, la de bicarbonato de sodio 2.75 y la de fenol 4%.

**CLARIFICACION**

Después que el material ha sido extraído, el solvente conteniendo los ingredientes activos, debe ser separado del material inactivo. Esto es llevado a cabo por filtración preliminar, la cual también remueve las partículas suspendidas que pueden obstruir

los filtros retenedores de bacterias, usados después para esterilizar la solución. Debido a que este proceso es algunas veces lento, es mejor el uso de un embudo bouhner de succión para acelerar la operación, muchas otras sustancias pueden ser filtradas a través del filtro grueso de papel o a través de una maya fina. Otros métodos usados para la clarificación dependen de las características individuales del material a tratar por ejemplo: centrifugación con subsiguiente decantación del fluido flotante; enfriamiento del material dejándolo reposar en un refrigerador 12 horas o congelándolo en una congeladora.

## DIALISIS

Es a menudo deseable dializar un extracto después de clarificado. Esto es particularmente cierto con extractos de polvos - jugos de papas, espinacas, remolacha y mostaza, los cuales tienden a dar reacciones falsas positivas sino son dializadas.

El propósito de la diálisis es librar a los extractos de ingredientes irritantes, materiales colorantes que pueden teñir la piel del paciente, y electrolitos no deseables. Esto es usualmente llevado a cabo colocando el extracto en bolsas o tubos de papel celofán y dializándolo en agua corriente o en una solución salina amortiguada. Las proteínas y los polisacáridos son retenidos dentro de la bolsa de celofán, los colorantes, los materiales irritantes y los electrolitos, pasan a través de la pared del celofán hacia la solución dializante. A menudo es deseable obtener la misma concentración electrolítica del extracto que es dializado.

Esto puede ser llevado a cabo dializando el extracto con una solución conteniendo la misma clase de electrolitos y en la misma concentración a que se encuentran en el extracto. Por ej. un extracto preparado en solución salina amortiguada sería dializado en una solución salina amortiguada. La diálisis es llevada a cabo por muchos días cambiando el fluido dializante cada cuatro horas, la diálisis es normalmente completada aproximadamente después de seis cambios de fluido.

Al principio de la operación el volumen del extracto debe ser medido y si el extracto gana o pierde volumen durante el proceso, debe ser concentrado o diluido a su volumen original, cuando la diálisis es terminada. Por este medio la concentración original es mantenida.

En la preparación de extractos la diálisis es usada solamente cuando está indicada. Por ej. jugo de mostaza, remolacha, papas y espinacas, deben ser dializadas antes de ser concentradas o ellos producirán reacciones falsas positivas. Sin embargo, generalmente se cree que a menos manipulaciones sean sometidos los extractos, ellos serán más satisfactorios.

## CONCENTRACION

Algunos materiales como jugos de frutas son concentrados varias veces con el objeto de obtener concentraciones altas de los principios activos en un volumen dado y así obtener un producto más potente.

El material usado para el ensayo de escara es también concentrado por la misma razón.

La concentración es efectuada por evaporación del agua sin el uso de calor. Uno de los varios métodos siguientes pueden ser empleados usando un disco de evaporación o suspendiendo el material en un tubo o saco de celofán y dejando que el material se evapore por sí mismo. Esto puede ser apresurado ventilando aire por medio de un abanico sobre el material durante el proceso. Un tubo de celofán de 24/32 pulgadas puede ser utilizado para la concentración.

### ESTERILIZACION

Ya que los alergenos son inestables al calor deben ser esterilizados por filtración bacteriológica. El filtro Zeisth es preferido por muchos farmacéuticos porque el disco del filtro puede ser fácilmente removido y descartado e insertar uno nuevo después de cada proceso de filtración evitándose de esta manera la contaminación de una solución alérgica con pequeñas cantidades de otra.

El tipo de filtro Berkefel o Selas puede ser usado con satisfacción y es preferido por muchos farmacéuticos porque ellos producen soluciones claras con más rapidez. Estos últimos pueden ser obtenidos ya en tamaños pequeños de 3/4 de pulgada y 4/8 como en tamaños más largos. Las candelas más pequeñas son deseables solamente cuando una pequeña cantidad del extracto va a ser filtrado, en esta forma el aumento de absorción es reducido.

La preparación por filtración es convenientemente llevada a cabo por presión o succión con el filtro fijo a un recipiente colector. El tamaño del filtro debe ser comparativamente pequeño con el volumen de la solución a filtrar para evitar el exceso de absorción de los principios activos del extracto de la sustancia por el filtro. Por la misma razón una repetición de la filtración debe ser evitada.

Después de la filtración los extractos son asepticamente transferidos a un frasco estéril de dosis múltiples y una muestra del producto es apartada para el ensayo de esterilidad. Ya que muchos extractos han sido preparados por sustancias que han estado en contacto con el suelo el ensayo de esterilidad debe incluir pruebas tanto para bacterias anaerobias como para aerobias.

### ESTANDARIZACION

Hay cuatro métodos comunmente usados para la estandarización de extractos de polen. Uno de éstos es la unidad polen de Noon, la unidad Noon significa que un gramo de polen seco contiene 1.000.000 de unidades polen. Así, un extracto de polen al 1% contiene 1.000.000 por 100 cc. o 10.000 UU por cc.; dicho de otra manera, una 1 UU equivale a 0.001 mg. de polen.

Esta nomenclatura es muy frecuentemente usada y los extractos son preparados en concentraciones que varían de una unidad por cc. a 10.000 UU por cc.

Los extractos de polen son estandarizados de acuerdo con su contenido total de nitrógeno expresado como fracciones decimales

teico, así como el proteico. Generalmente se cree que este método no es exacto para medir el nitrógeno proteico o el contenido de proteínas del extracto. La unidad de nitrógeno proteico representa solamente el N obtenido de la fuente proteica y no incluye el nitrógeno no proteico del extracto.

Se ha pensado que este método de estandarización es más exacto ya que la fracción no proteica la cual puede componer hasta los  $\frac{2}{3}$  del N total no entra en consideración. La unidad proteica fue seleccionada como 0.0001 mg. de N Proteico.

Por este método la escala de dosificación varía entre 1 unidad y 100.000 UU.

Usualmente el N proteico se determina por el método de Kjeldahl determinando primero el N total de una muestra del extracto, precipitando entonces con ácido fosfotungstico la proteína de otra muestra y determinando el N no proteico.

Substractando la cantidad figurada para el N no proteico de la del N total nos dará el contenido de N proteico.

Siempre que los extractos sean estandarizados de acuerdo a su contenido de nitrógeno, esta operación debe llevarse a cabo después que los extractos hayan sido esterilizados por filtración.

Tabla # 1

COMPARACION DE LOS DISTINTOS VALORES DE LAS UNIDADES DE LOS EXTRACTOS DE POLENES.

peso	Mlg total	Unidades en	Unidades
por volumen	nitrógeno	N proteico	Ncon
1 ml de:			
1:1.000.000	0.000016	0.64	1
1:100.000	0.00016	6.4	10
1:10.000	0.0016	64.0	100
1:1000	0.016	640.0	1000
1:100	0.16	6400.0	10.000

La tabla 1 muestra valores comparativos de diferentes unidades y hace posible la conversión aproximada de uno para otro. El nitrógeno total es expresado con milg y el proteico en unidades. Se presume que el nitrógeno proteico es aproximadamente el 40% del nitrógeno total. Otros extractos por ejemplo, ciertos alimentos, extractos epidérmicos y otros pueden ser estandarizados por una variedad de métodos los cuales incluyen peso para volumen, nitrógeno proteico y nitrógeno total.

Ciertas sustancias no se prestan por sí, para la estandarización por el contenido de nitrógeno. Estas son estandarizadas por el peso para volumen en el caso de ciertas comidas conteniendo

una gran cantidad de jugo se estandarizarán de acuerdo a diluciones del jugo fresco. En adición los extractos pueden ser estandarizados por su contenido proteico. Esto puede ser llevado a cabo indirectamente multiplicando el contenido de N determinado por el método Kjeldahl por el factor 6.25 el cual da aproximadamente el contenido de proteína.

Los extractos son después rotulados en miligramos de proteína contenida por cc.

### CONSERVACION DE LOS EXTRACTOS ALERGENICOS

Para su máxima estabilidad los extractos alergénicos deben ser conservados en refrigeración a 5°C o a 10°C. Los extractos que contienen por lo menos el 50% de glicerina son estables por cuatro años. Otros son estables por dieciocho meses. Los extractos de hongos son estables por tres años si son conservados a una temperatura que no exceda los 5°C.

### PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS ILUSTRATIVOS

Los distintos métodos que describiremos a continuación han sido usados y han producido extractos satisfactorios. Sin embargo la variación de estos métodos es posible y algunas veces deseable, por ej.: algunos farmacéuticos prefieren llevar a cabo la extracción a una temperatura aproximada de unos 5°C y el tiempo de extracción puede variar al descrito aquí. Soluciones específicas extractantes y concentraciones han sido mencionadas con el objeto de hacer la descripción más concreta. Sin embargo una cantidad variable de fluidos extractantes hay disponibles y muchos de ellos satisfactorios. Algunas concentraciones de los extractos pueden ser y frecuentemente son diferentes a aquellos descritos aquí. Por ej. el material para ensayo intracutáneo puede ser diluido a 1 para 500, 1 para 5.000, 1 para 50.000 con iguales resultados satisfactorios, y otras concentraciones pueden ser seleccionadas; o las diluciones pueden basarse de acuerdo al contenido de nitrógeno del extracto. En el caso de los pólenes, ésta puede ser de acuerdo a las unidades polen usados o su contenido de nitrógeno. Lo importante es tener una serie de diluciones uniformes las cuales producen resultados clínicos satisfactorios.

### POLENES

Solamente unos pocos de los pólenes más comunmente usados serán descritos aquí, numerosos otros son usados en la preparación de extractos.

### ORIGEN Y COLECCION DE POLENES

El origen de la materia prima es importante, hay casas especializadas en la colección de pólenes o éstos pueden ser recolectados por uno mismo. El factor más importante en la colección de los pólenes es una inmediata y pronta deshidratación. Cloruro de calcio o aire caliente son usados para deshidratar el polen tan pronto es recolectado. En algunos pólenes el contenido de humedad puede variar en los diferentes períodos de colección hasta un 40%.



frascos perfectamente tapados.

Existe una gran variación en la potencia antigénica de los pólenes de un año para el próximo.

Suficiente cantidad de extracto debe ser preparada de una sola vez para un año o puede dar lugar a la confusión en el tratamiento - al cambiar extractos después que la estación ha empezado y el tratamiento ha sido iniciado. La inmediata eliminación de la humedad es importante porque durante más tiempo el material esté húmedo su potencia antigénica será menor. El contenido de nitrógeno es una indicación de la potencia del polen, pero es el nitrógeno proteico el que muchos alergistas consideran el factor importante. Cuando el polen se deja en estado húmedo el contenido de nitrógeno total permanece - el mismo, pero alguna parte del nitrógeno proteico puede ser convertido a nitrógeno no proteico. Debe existir también la menor contaminación posible del material colectado. No debe existir más del 5% - de material contaminante (polvo, restos de insectos etc.) en cada muestra.

METODO DE PREPARACION

Desengrasar el polen tres veces con éter. Dejar secar. Agregar tres gramos del polen así desengrasado a suficiente cantidad de solución extractante hasta completar 100 cc. Agregar 0.1 cc. de tolueno y extraer a temperatura ambiente durante 72 horas agitando - la vez en cuando. Después se filtra a través de papel filtro. Remover el tolueno por evaporación. Esterilizar el extracto por filtración a través de bujía. Transferir el filtrado asepticamente dentro de viales estériles. Taponear con tapones también estériles y sellarlos. Este extracto al 3% es usado para ensayo de escara. Si se desea un extracto más concentrado esto puede concentrarse dos hasta diez veces más.

Para preparar con este extracto material para ensayo intracutáneo se diluye el extracto al 3% con solución buffereada salina estéril a las concentraciones de 1 por 1.000, 1 por 10.000, y 1 por 100.000.

Estas diluciones al 1 por 100.000 al 1 por 10.000 y 1 por 1000 pueden ser usadas para tratamiento.

SUSTANCIAS EPIDERMICAS

En este grupo se encuentran las siguientes sustancias: Pelos plumas.

- Pelos
- Cato
- Camello
- Caca
- Perro
- conejo

- Plumas
- Aves de corral.



Carnero  
Cabra  
Cerdo

Cortar el pelo o plumas con tijeras en pequeños pedazos (Las plumas deben obtenerse directamente de las aves y se debe de tener precaución de que no se contaminen con sangre o agua). Desengrasarlo con éter por tres veces consecutivas. A cada gramo del material secado. Agregar suficiente líquido extractante hasta completar 5 cc. Agregar una pequeña cantidad de tolueno y extraer durante doce horas agitando ocasionalmente. Filtrar el extracto a través de papel filtro y después de evaporado el tolueno se esteriliza a través de bujía o Zeitz. Este extracto al 1 para 5 es usado para el ensayo de escara.

Para ensayo intracutáneo es necesario diluirlo diez veces con solución amortiguada salina estéril; en concentraciones del 1 a 10, 1 x.100, 1 por 1000 es empleado para ensayo y tratamiento.

Manzana  
Espárragos  
Coliflor  
Limón

Naranja  
Peras  
Duraznos  
Papas

Espinacas  
Remolachas

Remover el pericarpio de la fruta. Extraer el jugo a través de papel filtro y se le agrega 10 cc. de solución amortiguada salina a 200 cc del jugo. Se concentra en un tubo de celofán a 100 cc; esterilizar por bujía o zeitz y transferir asepticamente a un recipiente estéril. Este extracto es para ensayo de escara. Los extractos de este grupo son concentrados con el objeto de obtener una mayor concentración de sólidos.

Para preparar el extracto para ensayo intracutáneo se diluye el jugo fresco extraído en concentración del 1 por 10 con solución salina buffer y se esteriliza por filtración.

## CARNES

Están incluidos en este grupo los siguientes:

Carne de:

Res  
Pollo  
Cerdo  
Cordero  
Ternera etc.

En la preparación de los extractos de carne es importante que el material a extraer contenga la menor cantidad de sangre posible. Remover el tejido conjuntivo y el exceso de sangre de la carne. El tejido conjuntivo cuando se mezcla con solución glicero salina forma un gel. Triturar la carne en un molino y desengrasarla varias veces con éter. A 25 gramos del material desengrasado agregar suficiente líquido extractante hasta completar 100 cc y extraer bajo tolueno (hasta 72 horas). Filtrar el extracto por papel o tela y esterilizar:

lo por filtración. Este extracto así obtenido es adecuado para ensayo de escara. Para ensayo intracutáneo se diluye 10 veces con solución estéril amortiguada salina.

Otro método de preparación de este grupo de extractos se hace obteniendo sangre fresca del animal y se deja en el refrigerador durante 48 horas hasta coagulación luego se centrifuga y el suero obtenido se diluye con un volumen igual de glicerina y la mezcla resultante se esteriliza por filtración. Este extracto se usa para ensayo de escara; para ensayo intracutáneo se diluye el suero al 1 por 10 con solución amortiguada salina y se esteriliza a través de Zeitz o bujía.

#### CLARA DE HUEVO

La clara de huevo fresca se separa de la yema y se diluye al 1 por 10 con solución glicero-salina. La solución así preparada se esteriliza por filtración y se usa para la prueba de escara. El material para prueba intracutánea se prepara diluyendo la clara en solución amortiguada salina al 1 por 1000 y se esteriliza a través de bujía.

#### YEMA DE HUEVO

La yema se diluye al 1 por 10 con solución glicero-salina después se desengrasa esta mezcla con éter. Después de eliminar el éter se filtra la solución por bujía ésta se emplea para prueba de escara, para uso intracutáneo se usa al 1 por 1000.

#### LECHE

Primero se elimina la caseína de la leche fresca desnatada. Esto se logra agregando 3 cc de una solución al 1 por ciento de renina o por medio del equivalente en tabletas de cuajo comerciales; la mezcla se incuba a 37°C por treinta minutos sin agitarla. El coágulo formado contendrá la caseína la cual se elimina por filtración; el filtrado contendrá lactoalbúmina. La lactoalbúmina se elimina agregando 3 volúmenes de acetona al filtrado y la mezcla se conserva en el refrigerador durante 24 horas. El precipitado resultante se recolecta, seca y se pulveriza. Un gramo de esta lactoalbúmina seca se extrae con 50 cc de solución buffer glicero-salina durante 72 horas; luego se filtra a través de papel filtro y finalmente se esteriliza por filtración bacteriológica. En esta concentración es usado para prueba de escara.

Para prueba intracutánea se diluye veinte veces con solución amortiguada salina estéril.

#### SUSTANCIAS QUE CONTIENEN RESINAS, ACEITES O MATERIALES IRRITANTES

En este grupo encontramos:

Cacao	Gengibre	Chile
café	Mostaza	Semilla de algodón
Té	Pimienta.	

Con el objeto de eliminar las resinas, los aceites volátiles y las demás sustancias irritantes el material molido se lava sucesivamente con tolueno, alcohol y éter. El extracto se prepara exactamente por el mismo procedimiento que los alimentos incluidos en el grupo uno, con la excepción que los incluidos en este grupo deben dializarse en soluciones amortiguadas glicero-salina antes de esterilizarse por filtración.

## POLVO

En este grupo se incluye el polvo de casa, de colchones etc.

El polvo ordinario de las casas es recolectado preferiblemente con un limpiador al vacío eléctrico.

Después de secado se lava con tolueno, alcohol y éter sucesivamente. Luego de evaporar estos solventes el polvo seco se extrae con solución amortiguada glicero-salina baja tolueno, por setenta y dos horas; a cada gramo de polvo se le agrega solución buffer, cantidad suficiente hasta completar cinco centímetros cúbicos. Después de la extracción el material se filtra a través de papel filtro. El filtrado se dializa en solución amortiguada glicero-salina por veinte y cuatro horas. Las sales de pequeño peso molecular y las sustancias colorantes son eliminadas por medio de este proceso. El antígeno del extracto se considera de peso molecular elevado por lo tanto no pasa a través de la membrana semipermeable durante la diálisis.

Si es necesario el extracto dializado se concentra a su volumen original. Después de evaporar el tolueno el extracto se esteriliza por filtración. Este material al 1 por 5 se usa para prueba de escara. Para el ensayo intracutáneo se diluye en concentración del 1 por 50 en solución amortiguada salina estéril.

Algunos alergistas usan este extracto en concentraciones del 1 por 1.

## ALIMENTOS MARINOS

En este grupo incluimos los siguientes:

Ostras	Langosta	Salmón
Conchas	Camaron	Peces etc.

De este grupo se prepara usualmente extracto para ensayo de escarificación. Se emplea siempre la proteína seca. A un gramo de proteína se agrega 20 cc. de solución al décimo normal de hidróxido de sodio en un frasco estéril de dos onzas de capacidad. Dejar en reposo agitando de tiempo en tiempo durante setenta y dos horas. Entonces agregar cinco centímetros cúbicos de solución buffer salina estéril y 25 cc. de glicerina o de propileno glicol, mezclar perfectamente.

El material así preparado se utiliza en el ensayo de escara.

## HONGOS

Incluimos en este grupo los siguientes hongos:

<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Candida</i>	<i>Trichophyton</i>
<i>Mucor</i>	

Para la preparación de extractos de hongos requiere una cuidadosa selección de esporas, las cuales se cultivan en medio especial; por ej. 0.1% de caldo de pectona.

La spora inoculada se deja desarrollar en el medio de cultivo a temperatura ambiente hasta obtener el máximo desarrollo. Luego se filtra el medio. La película o nata del hongo obtenido por filtración se coloca en alcohol a 95°C. por 48 horas con el objeto de destruir las esporas.

Luego el material se deja secar y se reduce a polvo fino después es desengrasado con éter. Un extracto al 5% se prepara usando solución amortiguada glicero-salina y dejando el material en maceración durante cuatro a cinco días.

Luego se clarifica y esteriliza por filtración.

Así preparado se emplea para ensayo de escara. Diluciones al 1% son usadas para ensayo intradérmico y para tratamiento.

### CONSIDERACIONES GENERALES

El tratamiento hipersensibilizante debe ser siempre suave y a partir de concentraciones débiles. Una norma de seguridad es que la dilución inicial sea cien veces más diluida que aquella que ya no produzca reacción por escarificaciones. Las inyecciones son subcutáneas comenzando por una décima hasta un centímetro; después de esta dosis se pasa a dos décimas de la dilución siguiente, que es diez veces más concentrada para aumentar también de décima en décima, y así sucesivamente. El intervalo entre las inyecciones no debe ser por lo general inferior a cuatro días. La progresión de las inyecciones debe detenerse por debajo del nivel productor de reacciones focales (empeoramiento del síndrome ligado a la inyección), y debe evitarse toda reacción general. Son recomendable en general, tratamientos de larga duración y perennes. En éstos, el reponer extractos con otros de reciente preparación debe retrocederse la dosis hasta una tercera parte o hasta 1/10 parte de la última inyectada, ante la posibilidad de una diferencia involuntaria en la valoración y también por resultar los preparados recientes más potentes que los guardados largo tiempo por el enfermo. Con esta precaución se evitan la mayoría de reacciones generales inmediatas que pueden producirse después de la inyección y que son semejantes al shock anafiláctico y no exentas de peligro. Por lo mismo es prudente siempre mantenerse en una zona de seguridad en la dosificación y hacer permanecer al enfermo durante algún tiempo (media hora) en el consultorio, después de practicada la inyección para poder tratar toda eventual reacción de este tipo por medio de

nalina desde el momento de iniciarse y añadiendo inyecciones intravenosas de aminofilina si fuere preciso.

o o o o

BIBLIOGRAFIA

THE JOURNAL OF ALLERGY

ANNALS OF ALLERGY

POLINOSIS. ESTUDIO CLINICO Y BOTANICO

PRACTICE OF ALLERGY (Vaughan and Black)

o o o o

