

2 E. No. 63



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DEL COMPLEJO TRIPSINA-HEPARINA
EN UN MEDICAMENTO.**

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

ROSA ELVIRA LUNA ROSAS

México, D. F.

1984



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.

CONTENIDO.

INTRODUCCION.	1
OBJETIVO	4
GENERALIDADES	5
Fisiopatología	8
Reportes clínicos	11
Características del complejo	13
METODO ANALITICO PROPUESTO	
Para Tripsina	16
Para Heparina	21
GRAFICAS	29
RESULTADOS	31
CONFIRMACION DE RESULTADOS	36
CONCLUSIONES	44
REPORTES BIBLIOGRAFICOS	46

INTRODUCCION.

En las últimas décadas el interés por las enfermedades tromboembólicas ha aumentado, en la misma medida en que las complicaciones a que dan lugar se ven con mayor frecuencia.

Desde el punto de vista etiopatogénico la información de que se dispone continúa siendo insuficiente para explicar adecuadamente la génesis y el mecanismo íntimo de desarrollo de la trombosis. Debido a lo anterior ninguno de los procedimientos terapéuticos tiene valor universal, ni todos en su conjunto ofrecen una resolución satisfactoria del problema.

La introducción de sustancias que tienen actividad fibrinolítica, en la terapéutica de las trombosis, como las estreptocinasas, obtenidas al través de un procedimiento de purificación de una lisina estreptocócica, ha sido limitada a causa del alto poder tóxico de las sustancias al aplicarse por vía parenteral.

Posteriormente han sido introducidas las enzimas proteolíticas pancreáticas, más específicamente la tripsina y la quimiotripsina; éstas dos enzimas son producidas con un alto grado de pureza. Ambas tienen actividad fibrinolítica in-vitro, en cambio in-vivo la acción lítica solo se desarrolla por vía local.

Administradas parenteralmente las dos enzimas, demues-

tran un efecto antiinflamatorio y la acción terapéutica es por consiguiente de tipo antiflogístico.

Por lo que se refiere a la acción fibrinolítica, ésta está ausente, la presencia de los inhibidores plasmáticos bloquea el efecto proteolítico de las enzimas y por consiguiente impide que actúen (7).

Más recientemente ha sido introducida la plasmina, cuya acción lítica directa sobre la fibrina constituye una base ideal para su empleo clínico, sin embargo la plasmina no ha podido ser producida en gran cantidad porque el material de que se parte está constituido por el plasma cuya producción es limitada.

Además se ha establecido que para obtener un resultado seguro se debe inyectar en promedio por día una cantidad de plasmina equivalente a la que se obtiene de 50 a 80 litros de plasma humano (3).

El interés de los Laboratorios Farmacéuticos se ha dirigido hacia la obtención de nuevos fármacos fibrinolíticos.

Una tentativa que parece poseer los requisitos para el éxito sobre el plano clínico, es la que parte de la consideración de que la tripsina además de un efecto proteolítico directo, posee un efecto activador sobre el plasminógeno o profibrinolisisina capaz de convertirlo en plasmina o fibrinolisisina.

(3, 6)

De Barbieri y Scevola (1960), han efectuado investigaciones dedicadas a la preparación de complejos de tripsina. Es-

ta es combinada con sustancias que sin influenciar las características específicas de la enzima misma, modifican la molécula, de modo de obstaculizar la combinación con el inhibidor plasmático (6).

La preparación de un compuesto que corresponda a tales características, ha permitido respetar la actividad triptíca en su totalidad, sea como fármaco proteolítico directo o como factor activador del proceso de conversión de plasminógeno a plasmina. Estos dos efectos se ven obstaculizados si la tripsina se combina con los inhibidores plasmáticos.

Se ha logrado éste propósito al preparar el complejo molecular TRIPSINA-HEPARINA, donde la heparina unida con la tripsina en un complejo molecular protege a ésta última de la acción de los inhibidores plasmáticos, por lo cual el complejo molecular puede desarrollar una actividad fibrinolítica tanto directa como indirecta (6, 11).

El complejo posee características físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas bien definidas. Las investigaciones efectuadas por De Barbieri y Scevola sobre el complejo molecular han permitido comprobar las siguientes propiedades:

- 1.- En las pruebas farmacológicas la toxicidad del complejo es muy escasa, la tolerancia resulta superior a la de una dosis igual de tripsina.
- 2.- Posee una capacidad notablemente baja de combinarse con los inhibidores triptícos, propiedad que lo hace más resistente que la tripsina a la inactivación "in-vivo".

- 3.- No modifica ni la circulación ni la respiración en los animales de experimentación.
- 4.- Ha demostrado poseer una elevada actividad fibrinolítica -- tanto in-vivo como in-vitro. Tal actividad fibrinolítica -- proviene de una acción proteolítica directa sobre la fibrina, e indirecta al través de una activación del plasminógeno a plasmina, siendo ésta la enzima con actividad fibrinolítica presente en el organismo.

OBJETIVO

El objetivo de éste trabajo es el desarrollo de un -- método analítico para la determinación del complejo TRIPSINA-HE PARINA en un producto farmacéutico, presentado como liofilizado con disolvente para recuperación al momento de usarse.

Este control permitirá obtener mayor seguridad en el manejo clínico del producto y por lo tanto obtener resultados -- más satisfactorios.

GENERALIDADES

El problema de la fibrinólisis ha sido objeto de numerosas investigaciones que se justifican por la necesidad de encontrar un medio terapéutico capaz de modificar los estados trombofilicos (hipercoagulabilidad) y sobre todo de resolver una trombosis en desarrollo, ya sea en las venas o en las arterias tomando en cuenta que todas aquellas enfermedades que representen al substrato de la trombosis misma (ateroesclerosis, obesidad, diabetes, etc.) van en aumento.

Los anticoagulantes dicumarólicos y heparínicos resuelven en parte este problema porque su acción está orientada exclusiva o particularmente en sentido profiláctico, más bien que curativo y, aún cuando se apliquen a un cuadro trombótico ya declarado, se espera de ellos que detengan la formación del trombo mismo y no la regresión del trombo ya formado.

(6)

Los estudios de éstos últimos años se han orientado a buscar un fármaco que pueda ejercer una acción directa sobre el trombo ya formado, disolviéndolo o acelerando el proceso fibrinolítico, en los casos en que éste se retrase. La presencia de una fibrinolisisina plasmática fisiológica, llamada -- plasmina, por su acción lítica directa sobre la fibrina, constituye una base ideal para su empleo clínico; sin embargo

la plasmina no ha podido ser producida en gran cantidad, porque el material de que se parte está constituido por el plasma, cuya producción es limitada y su empleo está preferentemente dirigido a fines transfusionales (11).

Mejores resultados han sido obtenidos por Christensen (1945), con la purificación de una lisina estreptocócica que no había sido posible utilizar en el pasado por su alta toxicidad. La lisina estreptocócica ha entrado ya en la parte clínica, pero solo para uso local (especialmente para aplicaciones en la cavidad pleural o abdominal con objeto de disolver y prevenir masas fibrinosas), a causa de las reacciones de tipo tóxico a que da lugar, cuando se inyecta por vía intramuscular o endovenosa. (4)

Un posterior avance fibrinolítico se efectuó en -- práctica clínica empleando la tripsina, enzima proteolítica de acción claramente fibrinolítica " in-vitro " y que presenta siempre " in-vitro ", la principal característica de la plasmina. Sin embargo, la acción "in-vivo" no parece tan clara y sus resultados terapéuticos son de menor cuantía cuando la enzima en vez de ser aplicada localmente se utiliza -- por vía parenteral, mediante inyección parenteral o subcutánea. Sucede en efecto que la tripsina se inactiva por contacto con el inhibidor plasmático, tornando casi nula o por lo menos reduciéndola al mínimo su acción terapéutica.

Por ésta razón, los estudios se orientaron hacia

la búsqueda de un complejo que permitiera a la tripsina desarrollar su propia acción, sin sufrir interferencias o inactivaciones por parte del inhibidor plasmático. Entre los varios agentes activos en tal sentido, se pensó recurrir a la heparina, puesto que las investigaciones efectuadas en 1956 por Mansfeld y Hladovec habían esclarecido las condiciones bajo las cuales se obtiene una interacción entre la heparina y la tripsina permitiendo la caracterización del complejo resultante.

En el complicado mecanismo de la coagulación asume notable importancia la fibrinólisis, que no es otra cosa que la lisis de la fibrina, se verifica en el organismo por la acción de agentes enzimáticos. Mediante tal proceso la fibrina formada como producto terminal de la coagulación sanguínea es sometida a una hidrólisis enzimática, que tiene por resultado su transformación en productos solubles (polipéptidos y aminoácidos). La enzima sérica capaz de lisar la fibrina (y también otras proteínas) es la plasmina, ésta no existe normalmente en la sangre ni en los líquidos orgánicos se encuentra presente en el plasma al estado de enzima inactiva denominada profibrinolisisina o plasminógeno (8, 9).

Es por lo tanto condición indispensable para que la fibrinólisis se efectúe el que el plasminógeno se transforme a plasmina. Dicha transformación se verifica en el plasma por obra de determinadas substancias llamadas activadores , presentes en la sangre , en los extractos de tejidos y en la

orina (uroquinasa). Algunas bacterias producen también activadores del plasminógeno; son fibrinoquinasas, por ejemplo, la estreptoquinasa de los estreptococos, la estafiloquinasa de los estafilococos. (4)

Pero en el plasma también se encuentran presentes substancias que pueden inhibir el proceso fibrinolítico; son los inhibidores de la plasmina.

La actividad fibrinolítica que normalmente existe en la sangre, puede sufrir variaciones, aún en condiciones fisiológicas; por ejemplo, puede aumentar después de esfuerzos musculares, emociones fuertes, etc. En cambio disminuye en la edad avanzada y en los individuos hiperlipémicos. (10, 13)

FISIOPATOLOGIA.-

Se refiere a dos procesos fundamentales; la trombosis y la hemorragia.

Trombosis.- es la coagulación de la sangre dentro de los vasos in-vivo; a los coágulos así formados se les llama trombos.

Principales causas por las que puede ocurrir trombosis.

la. Formación del trombo. Las alteraciones del endotelio vascular y el retardo en la circulación constituyen los dos factores fundamentales en la producción de trombosis. El último

favorece el depósito de plaquetas y su aglutinación porque la estasis sanguínea impide la dilución y arrastre rápido de -- los factores de la coagulación, especialmente la trombina.

Por su parte la lesión endotelial, da lugar a una superficie extraña, que lleva rápidamente a la metamorfosis viscosa de las plaquetas que se aglutinan y adhieren a la pared vascular, originándose la reacción en cadena que conduce a la formación del coágulo de fibrina o trombo. El coágulo se retrae y libera suero sanguíneo rico en trombina, que provoca nueva coagulación, así como también estimula la aglutinación de las plaquetas. Finalmente el trombo crece por formación sucesiva de nuevos coágulos.

2a.- Flebotrombosis. Trombosis posoperatoria y del posparto. Estas trombosis venosas se producen generalmente en los miembros inferiores y obedecen al retardo circulatorio en dichas extremidades, debido a inmovilidad muscular y a pequeñas lesiones del endotelio vascular (por compresión contra la mesa de operación o la cama).

El mecanismo de la formación del trombo es el ya señalado; de éste modo se forma un trombo alargado que puede extenderse desde las venas de la pantorrilla hasta las ilíacas, fijo únicamente por la base y que da lugar a embolias por desprendimiento de trozos.

3a.- Tromboflebitis. Es la inflamación de una vena por la

formación de un coágulo en donde hay una amplia y sólida adherencia de éste a la pared de la vena que está totalmente obstruida e inflamada, las embolias son raras. Pueden presentarse también tromboflebitis por infección. En éste caso los microorganismos lesionan el endotelio venoso en una zona amplia, en la que se fijan las plaquetas y se forma finalmente un coágulo adherente y firme, que por lo general llena la luz del vaso.

4a.- Aterosclerosis. Se producen lesiones en el endotelio arterial, debido a las placas ateromatosas, así como hemorragias en la misma con desgarre del tejido.

5a.- Endocarditis y fibrilación auricular. Los trombos se forman en el primer caso, en las válvulas cardíacas lesionadas y en el segundo, en las aurículas funcionalmente paralizadas.

Sintomatología de la trombosis.- Si el trombo formado obstruye una arteria y la circulación colateral no es capaz de mantener la nutrición del órgano respectivo, se produce mortificación del tejido o infarto, que puede provocar fenómenos serios y aún mortales como ocurre en el caso de trombosis coronaria que conduce al infarto de miocardio.

La trombosis venosa como sucede en el caso de la tromboflebitis de los miembros inferiores, lleva a la producción de edema.

Un peligro grave en los casos de flebotrombosis, es el desprendimiento de trozos del trombo, que vehiculizados -- por la corriente sanguínea pueden obstruir una arteria, causar embolismo de órganos importantes como el pulmón, originándose fenómenos que pueden ser mortales.

REPORTES CLINICOS CON LA COMBINACION MOLECULAR TRIPSINA-HEPARINA

Cazzolla después de una cuidadosa experimentación clínica, reporta los resultados favorables obtenidos con el complejo molecular TRIPSINA-HEPARINA en casos de obstetricia y ginecología.

Se trataron 37 pacientes con subinvolución uterina primitiva, esto es cuando durante el puerperio se forman coágulos en los puntos donde ha habido las conexiones materno-fetales. El tratamiento consistió en una ampolleta al día durante 5 días.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que de los 37 casos con subinvolución uterina puerperal, la terapia del complejo TRIPSINA-HEPARINA, ha dado resultados óptimos en 19 casos (51.4%), buenos (35.1%), mediocres en 4 casos (10.8%) y nulos en 1 (2.7%) (1, 3).

G. Enria y S. Garia, experimentaron el preparado en un grupo de 15 pacientes afectados de trombosis venosa. Llegaron a la conclusión de que el complejo es eficaz para dete-

ner el proceso trombótico venoso y favorece el retorno a la integridad funcional del miembro (6).

F. Vidili y L. Ferrara así como C. Vittori y F. Vittori, evaluaron los efectos del nuevo fármaco en afecciones de las venas y de las arterias obteniendo buenos resultados. (13).

En el Instituto de Cardiología de México se realizó un estudio experimental titulado, " acción de un fibrinolítico en la trombosis arterial " , realizado por Jorge Hernández Luis Antonio Márquez, Fernando Farrera Castañón y Bernardo Castro Villagrana.

Utilizaron 30 perros, cuyo peso fluctuó entre 15 y 30 Kg agrupados en dos lotes, uno control de 19 animales para probar el fármaco y otro de 11 para comparación. A los perros se les provocó embolias aórticas de las arterias y venas femorales, mediante la introducción directa en la luz aórtica de émbolos mezclados con citrato de bario. Después de terminada la intervención quirúrgica, a 19 animales, se les administró por vía intramuscular una ampolleta del complejo TRIPSINA-HEPARINA, cada 8 horas la primera semana; cada 12 horas la segunda y cada 24 horas la tercera y se hicieron estudios radiológicos .

Los autores concluyeron lo siguiente: " Los resultados de éste trabajo sugieren que las trombosis de ilíacas y femorales conducen al animal de experimentación a la muerte. La recanalización de las arterias en 11 de 13 animales a los

que se les administró el complejo TRIPSINA-HEPARINA y sobrevi
vieron, sugiere que el producto tiene acción lítica sobre el
coágulo y que ello pudiera ser el factor determinante en el
pronóstico de la insuficiencia arterial aguda.

Por otra parte la ausencia absoluta de toxicidad y
de complicaciones por el uso de este fibrinolítico, estimula
a emplearlo en la clínica en los procesos tromboembólicos, con
la esperanza de que el hallazgo de resultados similares a los
que se presentan en este trabajo, lleguen a respaldar el em-
pleo de tales fármacos en el tratamiento de este serio proble
ma " (8).

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO MOLECULAR

TRIPSINA-HEPARINA

A) La tripsina y la heparina reaccionan entre sí en u
na relación fija en peso de 6:1 obteniéndose la formación de
un complejo que tiene una composición constante.

El complejo contiene el 85.7% de tripsina y 14.3% -
de heparina. La actividad se expresa en unidades casinolíti -
cas. que sirven para valorar la actividad fibrinolítica del -
preparado, dado que, tomando como base las investigaciones -
realizadas se ha visto que existe una relación directa e ine-
quívoca entre las unidades así determinadas y la actividad fi
brinolítica directa y activadora del plasminógeno (1).

Esta actividad es determinada en base a la capacidad del complejo para lisar a la caseína.

Una Unidad Caseinolítica ha sido fijada como la cantidad de enzima que produce un aumento de 450 gamas de tirosina ácido soluble, al actuar sobre un substrato de caseína, después de 1 hora de incubación a 37°C.

B) Acción sobre la presión arterial y la respiración.-

El complejo está prácticamente exento de acción sobre la presión arterial y la respiración.

C) Acción sobre la actividad fibrinolítica del plasma.-

La comprobación de la actividad fibrinolítica se efectuó introduciendo, en una caja de Petri, fibrinógeno bovino recién preparado y agregando una solución de trombina para transformar el fibrinógeno a fibrina. La placa fue calentada y en la superficie de la película de fibrina fueron depositadas varias muestras de plasma en examen (plasma de conejos tratados con tripsina unos y con el complejo otros).

Después de un determinado tiempo de incubación y en correspondencia con cada una de las muestras del plasma en contacto con la fibrina, se forman zonas de lisis, con una extensión proporcional al grado de actividad fibrinolítica. (2, 12)

Mecanismo de acción del complejo sobre la fibrinólisis.- La actividad fibrinolítica del complejo es evidentemente-

te la más importante entre sus diversas acciones.

Depende de dos factores concomitantes :

- 1.- Un efecto proteolítico directo sobre la fibrina.
- 2.- Un efecto activador sobre la conversión del plasminógeno a plasmina.

Esta actividad fibrinolítica desarrollada por el preparado es debido al hecho de que la heparina, unida en un complejo molecular con la tripsina, protege a ésta última de la acción de los inhibidores plasmáticos, por lo cual el complejo puede desarrollar una actividad fibrinolítica, tanto directa como indirecta (14).

PRESENTACION DEL PRODUCTO FARMACEUTICO.

Frasco ampoula de producto liofilizado y ampolleta con disolvente.

METODO ANALITICO PROPUESTO.

A) TRIPSINA.

a) **Fundamento.-** Consiste en desdoblar la caseína en tirosina por acción de la tripsina presente en el complejo.

b) **Material utilizado.-**

1 balanza analítica.

Matraces aforados : 3 de 25 ml.

2 de 50 ml

7 de 100 ml

2 de 250 ml

2 de 500 ml

2 de 1000 ml

Pipetas graduadas y pipetas volumétricas.

12 tubos de ensaye.

1 termómetro.

1 piseta.

1 gradilla.

1 baño de María

1 espectrofotómetro.

1 cronómetro.

c) Preparación de soluciones.

1.- Solución problema.

i) Se prepara disolviendo 2 frascos, conociendo previamente la cantidad de muestra que varía alrededor de 100 mg , en un matraz aforado de 1000 ml con solución salina isotónica.

ii) 20 mg en el caso de materia prima en 500 ml de solución salina isotónica.

2.- Curva de calibración.

Se prepara pesando 50 mg de tirosina y se afora a -- 100 ml con una solución de ácido clorhídrico 0.0025N de ésta solución se hacen las siguientes diluciones:

50 mg = 0.5 mg/ml tomar 15 ml y aforar a 25 ml con HCl 0.0025N
100 ml

concentración = 0.3 mg/ml

" tomar 10 ml y aforar a 25 ml con HCl 0.0025N
concentración = 0.2 mg/ml

" tomar 5 ml y aforar a 25 ml con HCl 0.0025N
concentración = 0.1 mg/ml

" tomar 7.5 ml y aforar a 50 ml con HCl 0.0025N
concentración = 0.075 mg/ml

" tomar 2.5 ml y aforar a 25 ml con HCl 0.0025N
concentración = 0.05 mg/ml

Cada una de las soluciones preparadas se leen en un espectrofotómetro a 280 nm para obtener los puntos de la curva de calibración.

d) Reactivos.

i) Acido tricloro acético (TCA).

Se prepara una solución de ácido tricloro acético al 10% en agua destilada.

ii) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

Fosfato de potasio dibásico.- Disolver 1.75 g en 100 ml de agua destilada.

Fosfato de potasio monobásico.- Disolver 1.36 g en 100 ml de agua destilada.

Se toman 250 ml de la solución de fosfato de potasio dibásico y se le agregan 55 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico, así obtenemos una solución amortiguadora pH 7.4 . De éste amortiguador se toman 90 ml se les agregan 0.9 g de NaCl y con ésta solución se prepara la de caseína.

iii) Caseína.- Se prepara una solución de caseína al 6% en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 que contenga 0.9% de NaCl, se calienta en baño de María durante 20 minutos, agitando para ayudar a la disolución, se enfría y se lleva a pH 7.4 con solución diluida de NaCl y se afora a 100 ml con amortiguador de fosfatos.

PARTE EXPERIMENTAL

e) Procedimiento

Se colocan dos series de 4 tubos (para hacer el análisis por duplicado) marcados en la siguiente forma A1, B1, A2, B2, A3, B3 y dos tubos como blanco.

Tubos	ml de agua destilada	ml TCA	ml Problema	B. hielo	ml Caseína	V. final
A1, B1	1.5	-	0.5	4°C	4	6
A2, B2	3	2	-	4°C	-	7
A3, B3	3	2	-	4°C	-	7
B1, B2	5	2	-	4°C	-	7

10.- Agregar 1.5 ml de agua destilada a los tubos A1, B1.

20.- Agregar 3 ml de agua destilada a los tubos A2, B2, A3 B3.

30.- Agregar 5 ml de agua destilada a los tubos usados como blanco B1, B2.

40.- Agregar 2 ml de TCA (solución al 10%) a los tubos A2, B2, A3, B3, B1, B2.

50.- Agregar 0.5 ml de la solución problema a los tubos A1, B1.

Enfriar las dos series de tubos en baño de hielo a 4°C.

60.- Cuando se haya logrado la temperatura de 4°C añadir 4ml de la solución de caseína a los tubos A1, B1 mezclar rápidamente y poner el cronómetro a funcionar.

70.- Trasladar 2 ml de los tubos A1, B1 a los tubos A2, B2 y dejarlos en el baño de hielo.

80.- Incubar los tubos A1, B1 durante 1 hora a 37°C, descontando el tiempo trascurrido entre 6, 7 y 8 igual que el tiempo que demora en llegar a 37°C.

- 9o.- Terminada la incubación pasar 2 ml de los tubos A1, B1 a los tubos A3, B3 que se encuentran en el baño de hielo.
- 10.- Filtrar las soluciones finales de los tubos A2, B2, A3 B3.
- 11o.- Los tubos B1, B2 que se encuentran en el baño de hielo se utilizan para ajustar a cero en el espectrofotómetro
- 12o.- Las soluciones ya filtradas se leen en el espectrofotómetro a 280 nm .
- 13o.- Corregir las absorbancias de la forma siguiente:
- $$\text{Abs. corregida} = \text{Abs. tubos 3} - \text{Abs. tubos 2}.$$

Se saca un promedio de los tubos A3, B3 y de los tubos A2, B2 se realiza la resta de éstos promedios y se obtiene la absorbancia corregida.

La absorbancia corregida se lee sobre la curva de calibración de Tirosina, y así se obtiene las gamas de Tirosina/ml . Estas gamas de Tirosina divididas entre 450 nos dan las Unidades Caseinolíticas /mg .

Una Unidad Caseinolítica se define como la cantidad de enzima que produce un aumento de 450 gamas de Tirosina ácido soluble, al actuar sobre un substrato de caseína al 6% después de 1 hora de incubación a 37°C .

Las Unidades Caseinolíticas/mg se relacionan a la cantidad inicial de muestra, para obtener las Unidades Caseinolíticas/ fco .

B) HEPARINA.

a) Fundamento.- Consiste en la medición del tiempo de coagulación de un plasma citratado u oxalatado, agregando cantidades constantes de trombina, se prolonga si se le agregan cantidades crecientes de un preparado estándar de heparina.

b) Material utilizado.-

- 1 baño María de vidrio con termostato y agitador.
- 1 cronómetro.
- 1 jeringa tipo tuberculina (2 ml)
- 1 alambre de platino con la punta ligeramente encorvada y un manguete de 15 cm de largo.
- 1 balanza analítica.
- 1 centrifuga.
- 1 termómetro
- 1 embudo de filtración.
- 4 matraces Erlenmeyer de 150 ml con tapón.
- 1 matraz aforado de 1 l .
- 1 vaso de precipitado
- 12 tubos de ensaye
- 8 pipetas graduadas de 1 ml .
- 4 pipetas graduadas de 5 ml .
- Papel filtro

c) Preparación de soluciones.

1.- Plasma citratado:

Pesar 4 g de citrato trisódico y disolverlos en 50 ml de agua destilada, en un matraz aforado de un litro, aforar con sangre de novillo en el momento mismo del sacrificio en el matadero.

Se centrifuga por 30 minutos a 3000 rpm se sifonea el líquido sobrenadante, claro y límpido, respetando el sedimento. El plasma así obtenido se deja por 24 horas a 0°C. Después se pasan a matraces Erlenmeyer de 150 ml que después de taparse pueden ser conservados durante varias semanas a -10°C

Antes de usarse, este plasma debe ser fluidificado en baño María y filtrado por papel.

2.- Solución de heparina.

Se utiliza una heparina que contenga entre 100 y 130 U.I./mg. Para obtener la curva estándar se preparan varias diluciones de heparina al 0.1%, en forma de tener 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg de heparina/ml.

3.- Solución de trombina:

150 ml de una solución al 0.1% disuelta en agua destilada.

4.- Preparación de la curva estándar.

Puntos	Agua des tilada.	Trombina	Tomar 0.1 ml + 0.9 ml agua dest.	Tomar 0.5 + 0.5 H ₂ O	Adic. a Plas ma a 37°C.
--------	---------------------	----------	-------------------------------------	-------------------------------------	----------------------------

Base	0.5 ml	5 ml	" "	" "	1 ml
------	--------	------	-----	-----	------

Heparina

No 1	0.1 ml	0.4 ml	5 ml	" "	" "	" "
No 2	0.2 ml	0.3 ml	5 ml	" "	" "	" "
No 3	0.25 ml	0.25 ml	5 ml	" "	" "	" "
No 4	0.3 ml	0.2 ml	5 ml	" "	" "	" "

Tomar tiempo de coagulación. La operación se repite de 3 a 5 veces y se toma el promedio

i) Punto base (0.0mg/ml) . Es la coagulación en ausencia de heparina.

En un tubo de ensaye se coloca 1 ml de plasma y se lleva a baño María a 37°C exactamente. En otro tubo de ensaye se pipetea 0.5 ml de agua destilada y con otra pipeta se añaden 5 ml de la solución de trombina. De ésta solución se toman 0.1 ml exactamente medidos con una jeringa de tipo tuberculina y se lleva a 1 ml con agua destilada. Se vacía el contenido de la jeringa en un tubo de ensaye, se mezcla perfectamente y se absorben 0.5 ml , se lleva a 1 ml con agua destilada. Se vacía en el tubo ensaye que contiene plasma a 37°C disparando simultáneamente el cronómetro. Con el alambre de platino se efectúan movimientos verticales de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba hasta que el primer filamento de fibrina quede enganchado en el doblez terminal del alambre de platino, se detiene instantáneamente el cronómetro y se lee el tiempo que fue necesario para la coagulación. La operación se repite de 3 a 5 veces y se toma el promedio.

ii) Punto No 1 (0.2 mg/ml). En un tubo de ensaye se coloca 1 ml de plasma y se lleva a baño María a 37°C . En otro tubo de ensaye se pipetea 0.1 ml de la solución de heparina y con otra pipeta se agregan 0.4 ml de agua destilada. Obtenemos de ésta manera una solución que contiene 0.2 mg de heparina/ml . A ésta solución se le a

añaden 5 ml de solución de trombina. De ésta solución se toman 0.1 ml exactamente medidos con una jeringa de tipo tuberculina.

Se repite el mismo procedimiento como ya fue descrito para el punto base.

iii) Punto No 2 (0.4 mg/ml) . En un tubo de ensaye se coloca 1 ml de plasma y se lleva a baño María a 37°C exactamente. En otro tubo de ensaye se pipetea 0.2 ml de la solución de heparina y con otra pipeta se agregan 0.3 ml de agua destilada, obtenemos una solución que contiene 0.4 mg de heparina/ml , a ésta solución se le añaden 5 ml de la solución de trombina. De ésta solución se toman 0.1 ml exactamente medidos con una jeringa de tipo tuberculina.

Se repite el mismo procedimiento como ya fue descrito anteriormente.

iv) Punto No 3 (0.5 mg/ml) . En un tubo de ensaye se coloca 1 ml de plasma y se lleva a baño María a 37°C exactamente. En otro tubo de ensaye se pipetea 0.25 ml de la solución de heparina y con otra pipeta - se añaden 0.25 ml de agua destilada, obtenemos una solución que contiene 0.5 mg de heparina/ml , a ésta solución se le añaden 5 ml de la solución de trombina. De ésta solución se toman 0.1 ml exactamente medidos con una jeringa de tipo tuberculina.

Se repite el mismo procedimiento como ya fue descrito anteriormente.

iii) Punto No 4 (0.6 mg/ml) . En un tubo de ensaye se coloca 1 ml de plasma y se lleva a baño María a 37°C. En otro tubo de ensaye se pinetean 0.3 ml de la solución de heparina y con otra pipeta se agregan -- 0.2 ml de agua destilada, obtenemos una solución que contiene 0.6 mg de heparina/ml, a esta solución se le añaden 5 ml de la solución de trombina. De esta solución se toman 0.1 ml exactamente medidos con una jeringa de tipo tuberculina.

Se repite el mismo procedimiento como ya fue descrito anteriormente.

PARTE EXPERIMENTAL

d) Procedimiento:

Determinación de la actividad enzimática de preparados de heparina.- La determinación se efectúa en la misma forma que para la curva estándar.

En la tabla siguiente se exponen las dosificaciones adecuadas para preparados con diferente actividad.

Título probable en U de heparina/mg	Concentración recomendada para el análisis en mg/ml
130	0.4
110	0.5

90	0.6
70	0.8
50	1.1
30	1.6
10	6.0
1	50.0
0.5	100.0

El certificado de análisis de la materia prima utilizada en el estudio marcaba como título heparínico 73.3 U.I./mg . Por lo tanto la muestra problema se puede relacionar en la tabla con un título hipotético de 70 U/mg observándose que se requieren 0.8 mg , o sea 20 mg en 25 ml .

De ésta solución se pipetea 0.5 ml y se le añaden 5 ml de la solución de trombina.

Se repite el mismo procedimiento como ya fue descrito anteriormente para la curva estándar.

El tiempo de coagulación obtenido se interpola en la curva estándar y así se obtiene la concentración de heparina de la muestra problema.

La concentración de heparina obtenida de la curva estándar se multiplica por la potencia de la heparina utilizada

que fue de 110 U/mg y se divide entre la cantidad de muestra tomada y así obtenemos la cantidad de heparina/mg .

El certificado de análisis de la materia prima señalaba: para tripsina 81.1 Unidades Caseinolíticas /mg y para la heparina 73.3 Unidades Heparínicas/mg .

El producto terminado empleado contenía 50 mg/fco - que equivalían según el marbete a 2200 Unidades Caseinolíticas y a 1000 Unidades Heparínicas.

No se realizó la determinación de Unidades Heparínicas en producto terminado.

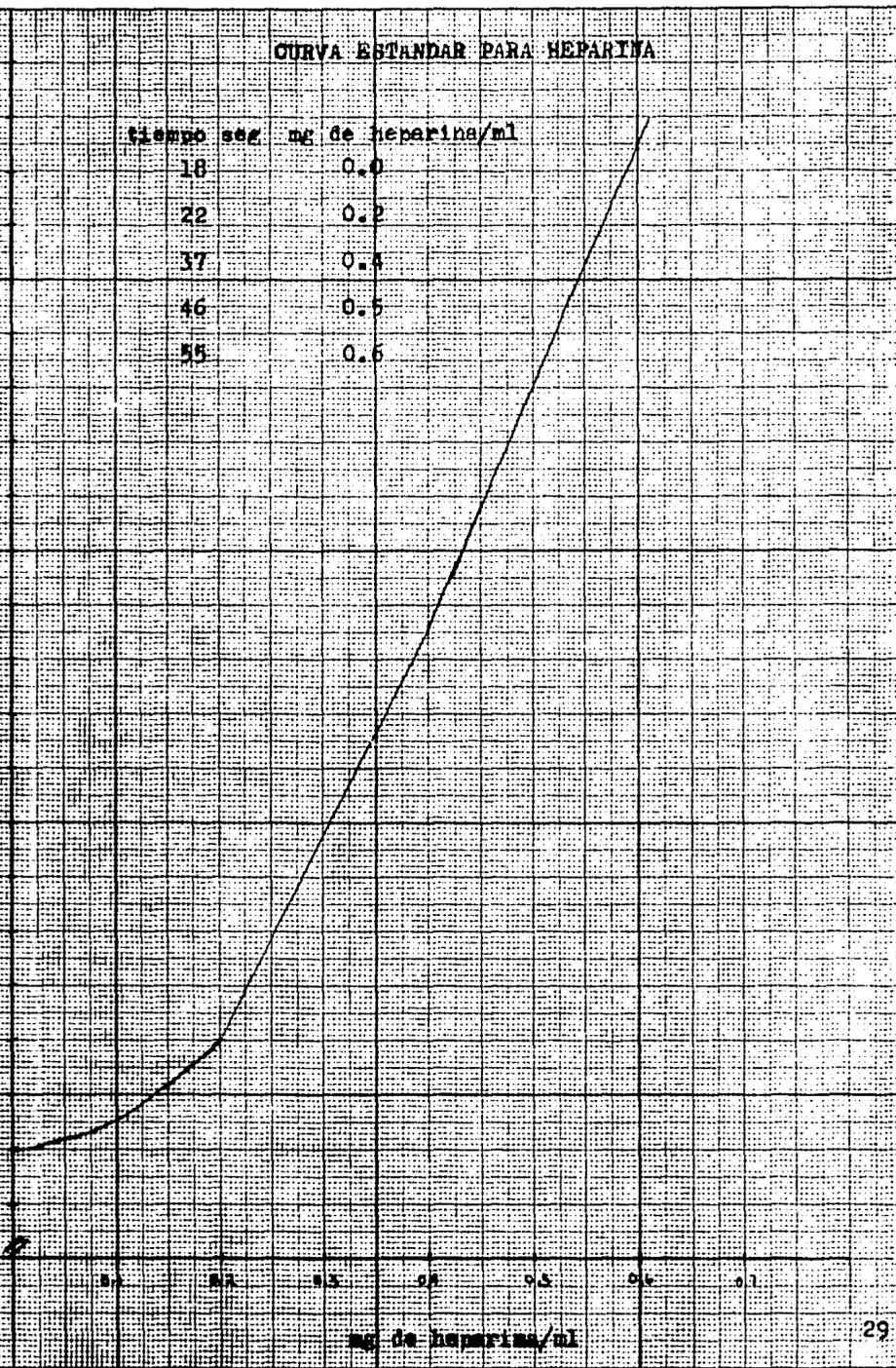
Tiem. de
ángula 36

CURVA ESTANDAR PARA HEPARINA

ción.
seg

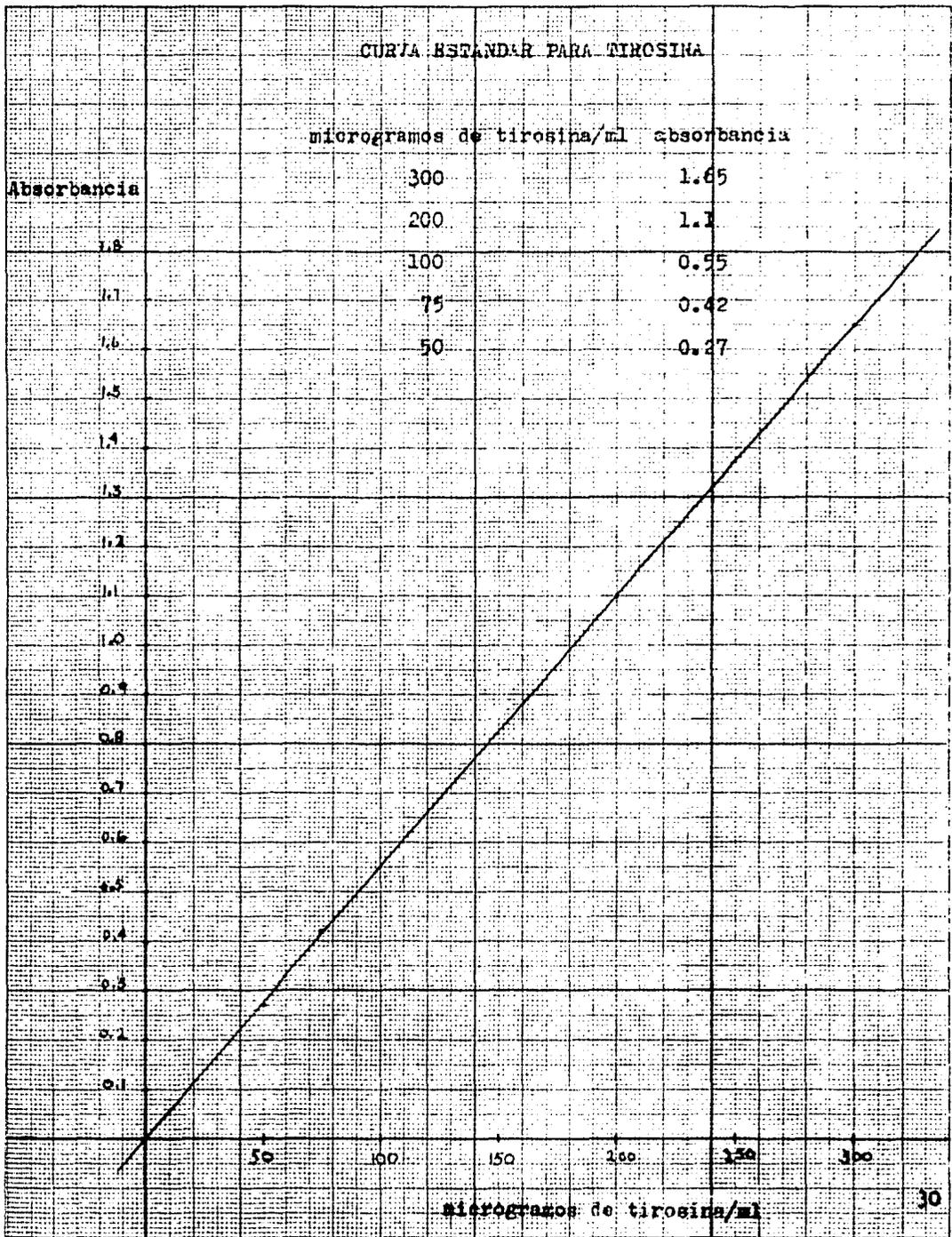
tiempo seg	mg de heparina/ml
18	0.0
22	0.2
37	0.4
46	0.5
55	0.6

54
52
50
48
46
44
42
40
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16



mg de heparina/ml

CURVA ESTANDAR PARA TIROSINA



microgramos de tirosina/ml

RESULTADOS.

Determinación de tripsina en la materia prima.

Muestra No.	Unidades Caseinolíticas/mg
1	81.6
2	80.77
3	81.6
4	78.9
5	80.77
6	80.5
7	80.77
8	81.16
9	82.07
10	80.0
11	78.9
12	81.16
13	81.6
14	81.16
15	81.3
16	84.0
17	79.6

18	81.16
19	81.6
20	79.6
21	81.16
22	81.6
23	81.16
24	78.9
25	81.6
26	82.07
27	82.07
28	81.6
29	82.07
30	81.6

Producto terminado.- Complejo Tripsina-Heparina

Determinación de Tripsina:

Muestra No.	Unidades Caseinolíticas/fco.
1	2240
2	2146
3	2146
4	2240
5	2146
6	2240
7	2146
8	2193
9	2240
10	2193
11.	2146
12	2240
13	2286
14	2146
15	2193
16	2240
17	2193

18	2240
19	2146
20	2193
21	2240
22	2286
23	2193
24	2193
25	2146

Determinación de Heparina en la materia prima:

Muestra No.	Unidades Heparínicas/mg
1	72.36
2	73.74
3	71.5
4	73.74
5	72.36
6	72.86
7	74.3
8	71.5
9	72.36
10	73.74
11	72.36
12	74.3
13	72.36
14	72.86
15	72.36

Confirmación de resultados.-

Tripsina en la materia prima.

Muestra No.	% de Unidades Caseinolíticas	$(X - \bar{X})$	$(X - \bar{X})^2$
1	100.6	0.61	0.3721
2	99.6	0.39	0.1521
3	100.6	0.61	0.3721
4	97.28	2.71	7.3441
5	99.6	0.39	0.1521
6	99.26	0.73	0.5329
7	99.6	0.39	0.1521
8	100.07	0.08	0.0064
9	101.19	1.2	1.44
10	98.64	1.35	1.8225
11	97.28	2.71	7.3441
12	100.07	0.08	0.0064
13	100.6	0.61	0.3721
14	100.07	0.08	0.0064
15	100.24	0.25	0.0625
16	103.57	3.58	12.8164
17	98.15	1.84	3.3856

18	100.07	0.08	0.0064
19	100.6	0.61	0.3721
20	98.15	1.84	3.3856
21	100.07	0.08	0.0064
22	100.6	0.61	0.3721
23	100.07	0.08	0.0064
24	97.28	2.71	7.3441
25	100.6	0.61	0.3721
26	101.19	1.2	1.44
27	101.19	1.2	1.44
28	100.6	0.61	0.3721
29	101.19	1.2	1.44
30	100.6	0.61	0.3721

$$\bar{X} = 99.98$$

$$\text{suma} = 52.8999$$

$$\text{Desviación estándar } S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}} = 1.3506$$

$$\text{Coeficiente de variabilidad} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = 1.3508$$

$$\text{Error} = \frac{S}{\sqrt{N-1}} = 0.2508$$

Límites de confianza = $\bar{X} \pm (t \times \text{error})$

Para el 99% con 29 grados de libertad $t = 2.7564$

$99.98 \pm (2.7564 \times 0.2508)$

99.2 - 100.0

Producto terminado.- Complejo Tripsina-Heparina.

Determinación de Tripsina.

Muestra No	% de Unidades Caseinolíticas	$(X - \bar{X})$	$(X - \bar{X})^2$
1	101.81	1.63	2.6569
2	97.54	2.64	6.9696
3	97.54	2.64	6.9696
4	101.81	1.63	2.6569
5	97.54	2.64	6.9696
6	101.81	1.63	2.6569
7	97.54	2.64	6.9696
8	99.68	0.5	0.25
9	101.81	1.63	2.6569
10	99.68	0.5	0.25
11	97.54	2.64	6.9696
12	101.81	1.63	2.6569
13	103.9	3.72	13.8384
14	101.81	1.63	2.6569
15	99.68	0.5	0.25
16	101.81	1.63	2.6569

17	99.68	0.5	0.25
18	101.81	1.63	2.6569
19	97.54	2.64	6.9696
20	99.68	0.5	0.25
21	101.81	1.63	2.6569
22	103.9	3.72	13.8384
23	99.68	0.5	0.25
24	99.68	0.5	0.25
25	97.54	2.64	6.9696

$$\bar{X} = 100.18$$

$$\text{suma} = 105.43$$

$$\text{Desviación estándar } S = \sqrt{\frac{(\sum (X - \bar{X})^2)}{N - 1}} = 2.1059$$

$$\text{Coeficiente de variabilidad} = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = 2.1021$$

$$\text{Error} = \frac{S}{\sqrt{N - 1}} = 0.4306$$

Límites de confianza = $\bar{X} \pm (t \times \text{error})$

Para el 99% con 24 grados de libertad $t = 2.7969$

$100.18 \pm (2.7969 \times 0.4306)$

98.97 - 101.38

Determinación de Heparina en la materia prima:

Muestra No.	% de Unidades Heparínicas	$(X - \bar{X})$	$(X - \bar{X})^2$
1	98.71	0.66	0.4356
2	100.6	1.23	1.513
3	97.54	1.83	3.3489
4	100.6	1.23	1.513
5	98.71	0.66	0.4356
6	99.39	0.02	0.004
7	101.36	1.99	3.9601
8	97.54	1.83	3.3489
9	98.71	0.66	0.4356
10	100.6	1.23	1.513
11	98.71	0.66	0.4356
12	101.36	1.99	3.9601
13	98.71	0.66	0.4356
14	99.39	0.02	0.004
15	98.71	0.66	0.4356

$$\bar{X} = 99.37$$

$$\text{suma} = 21.7786$$

$$\text{Desviación estándar } S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}} = 1.2472$$

$$\text{Coeficiente de variabilidad.} = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = 1.2148$$

$$\text{Error.} = \frac{S}{\sqrt{N - 1}} = 0.993$$

$$\text{Límites de confianza} = \bar{X} \pm (t \times \text{error})$$

Para el 99% con 14 grados de libertad $t = 2.9768$

$$99.37 \pm (2.9768 \times 0.993)$$

$$98.37 - 100.4$$

CONCLUSIONES.

1.- El objetivo primordial de haber realizado éste trabajo fue la necesidad de poseer un método analítico para el complejo Tripsina-Heparina, que permita determinar la actividad enzimática tanto de la materia prima como -- del producto terminado.

Este medicamento tiene gran importancia en la terapéutica para el tratamiento de problemas trombóticos.

2.- El complejo Tripsina-Heparina ejerce una acción a nivel de coagulación de tipo fibrinolítico, destruye la fibrina con la que se ha formado el trombo en las enfermedades tromboembólicas que pueden tener consecuencias graves, como por ejemplo durante el último período del embarazo o durante el puerperio, debido a la formación de coágulos en los puntos donde ha habido - conexiones materno fetales.

Al aplicar éste complejo, el trombo se destruye total o parcialmente y las probabilidades de salvar la vida aumentan.

3.- La exactitud se puede medir tomando en cuenta el error obtenido en el tratamiento estadístico, cuanto más pequeño es el error mayor es la exactitud.

La precisión es sinónimo de reproducibilidad. Un valor pequeño de desviación estándar supone alta precisión.

Las desviaciones estándar en los métodos efectuados fueron:

Para Tripsina en la materia prima.	1.3506
Para Heparina en la materia prima.	1.2472
Para Tripsina en producto terminado.	2.1059

Los errores en los métodos efectuados fueron:

Para Tripsina en la materia prima.	0.2506
Para Heparina en la materia prima.	0.3333
Para Tripsina en producto terminado	0.4306

4.- La determinación de Heparina en producto terminado no se realizó debido a la falta de trombina y heparina, pero debe llevarse a cabo como una seguridad más de la actividad enzimática.

REPORTES BIBLIOGRAFICOS.

- 1.- Arezzi Boza E. : Fibrinolytic anzymes and puerperal uteri ne involution. ; Riv. Ostet. Ginec. Prat. ; 44: 128-139 - (1962).
- 2.- Camerada P. ; Congiu M. and Leo P. : On the fibrinolytic action of a trypsin-heparin compound. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. ; 38: 2-31 (1962).
- 3.- Cazzola D. : On the use of the molecular combination of trypsin and heparin en thromboembolic manifestations of obstetrical and gynecological origin. Riv. Ostet. Ginec. Prat. 43: 520-527 (1961).
- 4.- Ciscar Rius F. y Farreras Valenti P. : Diagnóstico Hematológico. 3a edición, editorial Femus. Barcelona 1972.
- 5.- Connors Kenneth A. : Curso de análisis Farmacéutico. Editorial Reverté, Barcelona, Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México, Río de Janeiro. 1980.

- 6.- Enria G. and Gario L. : Clinical experience with the trypsin-heparin combination molecular regional venous and arterial therapeutic action. Minerva Med. 52 : 498 - 503 (1961).
- 7.- Fruton S. J. : Bioquímica General. Editorial Omega. Barcelona (1978).
- 8.- Hernández J. ; Márquez L. A. ; Farrera Castañón F. y Castro Villagrana B. : Acción de un fibrinolítico en la trombosis arterial. Archivo del Instituto de Cardiología de México. 4: 649-655 No 5 (1965).
- 9.- Litter M. : Farmacología Experimental y Clínica. 5a. edición. Editorial Ateneo. Buenos Aires, Lima, Río de Janeiro Caracas, México, Barcelona, Bogotá, Madrid. 1978.
- 10.- Maxwell M. ; Wentrobe M. : Hematología Clínica. Editorial Interamericana. México, España, Brasil, Colombia, Ecuador Uruguay, Venezuela. 1978.
- 11.- Scardigli G. ; Guidi G. and Lombardi V. : Clinical experience with trypsin-heparin mixture with fibrinolytic action. Minerva Med. 52: 416-421 (1961).

- 12.- Sicuteri F. ; Michelacci S. ; Franchi G. and Periti P. :
On the biological mechanism of the arterial hypotensive
effects of a trypsin-heparin complex. Boll. Soc. Ital.
Biol. Sper. 38: 667-669 (1963).
- 13.- Vidili F. and Ferrara L. : The fibrinolytic activity of -
the blood in thromboembolic diseases : Clinical research
with a new drug the trypsin-heparin molecular compound.
Minerva Cardioangiol. 11: 204-209 (1963).
- 14.- Zannini G. : Tratamiento de las trombosis venosas, agudas
y crónicas de los miembros. Terapia . 50: 366-384 (1965).
- 15.- The Merck Index . 9a edición.
- 16.- Merrill William C. y Fox Karl A. : Introducción a la Esta-
dística Económica. Editorial Buenos Aires . Argentina 1977