

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO TECNICO ECONOMICO DE TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRAFICO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

JULIA PEREZ RAMOS

1983



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.

INDICE.

	PAG.
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	3
III.- QUIMOTRIPSINA	8
a) Propiedades	
b) Obtención	
c) Análisis	
d) Usos	
IV.- TRIPSINA	53
a) Propiedades	
b) Obtención	
c) Análisis	
d) Usos	
V.- LIOFILIZACION DE TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA	69
VI.- FORMAS FARMACEUTICAS Y EFECTOS COLATERALES DE LA TRIPSINA Y - QUIMOTRIPSINA	71
VII.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	74
VIII.- BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUCCION

En la Industria Farmacéutica Mexicana, la mayor parte de la materia prima que se utiliza en ella, es de importación. Por tal motivo es necesario realizar estudios técnicos y económicos para que las materias primas sean obtenidas en México y así disminuir las importaciones.

El objeto principal de éste trabajo es realizar una recopilación técnica y económica de dos enzimas, la tripsina y quimotripsina para obtenerla en forma cristalina en México y así crear nuevas fuentes de trabajo.

El hecho de realizar el estudio de las dos enzimas, es que estas dos se encuentran en el páncreas, siendo posible extraerlas al mismo tiempo y además dentro de la Industria Farmacéutica se usan en forma combinada y solo en raras ocasiones en forma individual.

La tripsina y quimotripsina son enzimas proteolíticas que se localizan principalmente en el páncreas en forma inactiva, siendo posteriormente activadas por la enteroquinasa del intestino. Como su nombre lo indica, estas enzimas actúan sobre las proteínas, pero solo sobre determinadas proteínas y más específicamente sobre determinados enlaces de ellas.

En la Industria Farmacéutica tienen una gran aplicación, usándose principalmente en trastornos digestivos y en

procesos inflamatorios. En algunas ocasiones las enzimas se encuentran combinadas con antibióticos, expectorantes y algunos antihistamínicos. En la combinación con antibióticos se usan en contra de los procesos infecciosos, para que aquel presente una mejor acción. En el mercado estas enzimas se encuentran actualmente en varias formas farmacéuticas como son: Cápsulas, grageas, comprimidos y liofilizados.

Actualmente en México se obtiene una mezcla de tripsina y quimotripsina en varias proporciones, estas variaciones -- son de fabricantes la mezcla contiene impurezas, por tal motivo solo son utilizadas para uso oral. Las enzimas en forma más purificada son importadas de varios países de Europa y América.

GENERALIDADES

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran, retardan y en general regulan las diferentes reacciones que caracterizan los fenómenos vitales en los organismos vivientes. - En las plantas están las enzimas responsables de la fijación de la energía solar y la síntesis de las sustancias alimenticias. En los animales están las enzimas responsables de utilizar los alimentos con fines estructurales o energéticos; las funciones del metabolismo interno y de la vida de relación, como la Locomoción, la excitación, la irritabilidad, la división celular, - la reproducción, etc., todas las anteriores funciones están regidas por la actividad de innumerables enzimas responsables de que las reacciones se lleven a cabo en condiciones favorables - para el individuo, sin liberaciones bruscas de energía, a temperaturas fijas, en medio adecuado de pH, concentración salina -- prácticamente constante.

Las enzimas son catalizadores altamente específicos, que modifican la velocidad de las sustancias que catalizan, es decir, son las encargadas de graduar la velocidad de una sustancia determinada en el interior de la célula.

Las enzimas son de naturaleza proteica, de peso molecular elevado, no dializable y termolábil, formadas por alfa -- aminoácidos ligados por uniones pépticas, la forma en como se -

ordenan y disponen éstos determinan la especificación de la enzima.

Los aminoácidos se encuentran plegados formando una hendidura representante del sitio activo de la enzima donde encaja perfectamente el sustrato o los inhibidores, esto se conoce como la llave y la cerradura.

El sitio activo de la enzima es una parte muy pequeña de toda la molécula, estando constituida por los grupos funcionales de los aminoácidos situados en los diferentes repliegues de la cadena polipeptídica, estos grupos en el plano undimensional se encuentran muy lejanos, pero en el tridimensional están muy cercanos. Se ha demostrado el Sitio Activo por medio de sustancias químicas, como el Diisopropil Fluorofosfato (DFP). Después del bloqueo con DFP la reacción enzimática característica no se lleva a cabo. Por lo tanto, se deduce que la actividad enzimática de la enzima depende del sitio activo.

Para que se lleve a cabo una reacción enzimática, es necesario los siguientes factores:

La enzima propiamente dicha

El sustrato

Factores Físicos como son: Temperatura, pH, Potencia de Oxido Reducción y la presencia o ausencia de sustancias de activación o inhibición.

Para realizar la cuantificación de la enzima, ésta se

realiza siguiendo el curso de la reacción que cataliza por la aparición o desaparición de nuevas sustancias producto de la reacción. Los cambios que surgen son con respecto al tiempo, por lo tanto, la cuantificación debe realizarse al principio de la reacción, es decir, cuando está en línea recta ya que, con el tiempo la enzima es saturada con los nuevos productos siendo inhibida además también, pueden surgir modificaciones en el pH que alteren la actividad de la enzima.

La cuantificación es realizada en unidades convencionales, dependiendo de la sustancia que catalizan ya que no es posible expresarla en términos de molaridad o de pesos absolutos.

Nomenclatura

Algunas enzimas, las que fueron descubiertas en un principio, recibieron de manera especial nombres ligados a su sitio de procedencia anatómica, sin seguir ninguna regla o sistema como por ejemplo, la pepsina del estómago, la Tripsina del páncreas, la renina que coagula la leche, la papaina que se encuentra en la papaya, etc.

Al descubrir nuevas enzimas y proceder a su caracterización estricta, se aplicaron reglas de nomenclatura en el nombre del sustrato atacado ó el tipo general del sustrato o la reacción catalizada o añadiéndose al final del nombre la terminación ASA. Por ejemplo se les denomina estererasas a todas las

enzimas que fragmentan las uniones generales de tipo ester cuando es específica para los esteres del colesterol se denominan -colesterol esterasa.

Otra forma de clasificar a las enzimas, es de acuerdo a la unión atacada.

En el año de 1978 la Unión Internacional de Bioquímica adoptó el sistema de clasificación propuesta por la comisión de enzimas. Este sistema está basado en la reacción química que catalizan, agrúpanse en clases y subclases y al final la terminación ASA. En algunas ocasiones los nombres resultantes son demasiados largos, prefiriéndose los triviales.

Clasificación

1.- Oxido-Reductasas: Están relacionadas con las oxido-reducciones biológicas que intervienen de modo fundamental en los procesos de respiración y fermentación.

2.- Transferasas: Catalizan el traspaso de grupos químicos con excepción del hidrógeno.

3.- Hidrolasas: Este es un grupo muy numeroso de enzimas, las cuales tienen la capacidad de introducir los elementos del agua en el sustrato atacado, produciéndose la hidrólisis.

4.- Liasas: Catalizan la partición reversible de grupos químicos que son desprendidos de sus sustratos por mecanismos en los cuales no interviene la hidrólisis.

5.- Isomerasas: Son las enzimas que catalizan diferentes tipos de isomerización ya sea óptica, geométrica, funcional o de posición.

6.- Ligasas: Es un grupo de enzimas que permite la unión de dos moléculas, la cual sucede simultáneamente a la degradación del ATP, que libera la energía necesaria para llevar a cabo la reacción.

PROPIEDADES DE QUIMOTRIPSINA

La Quimotripsina es un polvo cristalino o amorfo de color blanco o blanco amarillento, sin olor. La forma cristalina es de tipo romboide.

- Solubilidad: Soluble en agua y en solución salina
- Pureza: Contiene no menos de 1000 UNF/mg. de Quimotripsina.
- Humedad: Secado a vacío a 60°C durante 4 horas no pierde más del 5% de su peso.
- Residuo de la Ignición: No más del 2.5%
- Punto Isoeléctrico: Es determinado midiendo las velocidades de migración de partículas de colodion, sumergidas en soluciones de enzima a diferentes pH. Para Quimotripsina, el punto Isoeléctrico se encuentra a un pH de 5.4 y para el Zimógeno es de 5.0
- Coefficiente de Difusión: Es determinado midiendo la velocidad de difusión del Nitrógeno Proteico. Para la Quimotripsina es de 0.037 cm/día a 6°C, para su Zimógeno correspondiente es de 0.039 cm/día.

Análisis Elemental en Base Seca:

Carbón	50.0%	Cl (-)	0.16 %
Hidrógeno	7.06%	S (=)	1.85 %
Nitrógeno	15.5%	Cenizas	0.12 %

Amino Nitrógeno como por ciento del nitrógeno total = 6.0 %

Digestión de Péptidos: Hidroliza los péptidos que envuelven los grupos carboxilo de los grupos - aromaticos de los Aminoácidos. Bergman y Fruton han mostrado que hidroliza polipéptidos en el cual la Tirosina o Fenil Alanina, suministra el péptido con el grupo carboxilo.

Comparación de Quimotripsina con la Tripsina: La Caseína es hidrolizada mejor por Quimotripsina -- que por Tripsina cristalina. La hidrólisis de la Caseína por las dos - enzimas ocurre en diferentes uniones, esto ha sido demostrado por el hecho de que cuando se pone Caseína hidrolizada a la Tripsina o a la inversa, hay un marcado incremento en la hidrólisis.

Miller ha encontrado que la quimotrip-
sina hidroliza 47-50 enlaces en la -

Lactoalbúmina, mientras que la Tripsi
na Hidroliza 33-35 enlaces.

Ball y Linewaver han encontrado que -
la Quimotripsina hidroliza la albúmi-
na de huevo 30 veces más rápido que -
la Tripsina.

Usos:

Principalmente una categoría proteolí
tica.

Dosis Usual:

Intramuscular 2500 a 5000 UNF/0.5 a -
1 ml dos veces por día.

Bucal: 10000 UNF cuatro veces por día

Oftálmica: Cerca de dos ml de una so-
lución que contiene 150 UNF/ml

Oral: De 50000 a 100000 UNF/mg. cua-
tro veces al día.

Efectos secundarios:

Puede causar una irritación local, en
algunas ocasiones causa una ulcera---
ción. Puede causar una gran variedad
de reacciones alérgicas incluyendo --
anafilaxis.

Conservación:

Debe almacenarse en envases bien tapa
dos, protegidos de la humedad y calor
excesivo.

OBTENCIÓN DE QUIMOTRIPSINA

La mayoría de los métodos reportados, están basados en la extracción de productos naturales y posteriormente precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio. La principal -- fuente de obtención es el páncreas de res y cerdo. Algunos Autores han extraído la quimotripsina de otros animales tales como; caballo; salmón, pollo, tiburón pequeño etc.

Para fines industriales la principal fuente de obtención es el páncreas de res y cerdo, los cuales son mas fáciles de conseguirlos en México. Estos son obtenidos de la Central - de Abastos, donde los animales son sacrificados, seleccionándose se las diferentes visceras que son usadas en las diferentes industrias que las soliciten. Las visceras son inmediatamente refrigeradas y limpiadas. En ésta forma son colocadas en cajas - especiales y congeladas, siendo almacenadas en cámaras frías - para su posterior distribución.

En el proceso de obtención se siguen varias etapas - como son:

- 1.- Extracción de Quimotripsinógeno
- 2.- Purificación de Quimotripsinógeno
- 3.- Activación de Quimotripsinógeno
- 4.- Purificación de Quimotripsinógeno.

EXTRACCION DE QUIMOTRIPSINOGENO.

La quimotrisina se encuentra en el páncreas en forma de zimógeno inactivo, conociéndose como quimotripsinógeno, por lo tanto el primer paso es la extracción de éste.

La extracción del quimotrisinógeno es realizada por el método tradicional de Kunitz y Northrop (19), usando páncreas de bovino fresco, si es difícil conseguirlo así se puede usar el congelado, para ésta etapa es necesario contar con material como: Charolas de acero inoxidable, tanques de almacenamiento con agitador mecánico, prensa mecánica, bombas de retroalimentación, molino de carne, centriugas, cámaras frías etc. Así como sustancias tales como; ácido sulfúrico, ácido acético y el páncreas.

Breve descripción del proceso de extracción.

En caso de utilizar páncreas congelado. Este es colocado en charolas de acero inoxidable, sumergido en ácido sulfúrico 0.25 N, en ésta forma se inicia el descongelamiento el cual es realizado en cámara fría y por un tiempo determinado, el descongelamiento puede ser ayudado por métodos mecánicos, tales como; ventiladores. Finalizado el descongelamiento se procede a la eliminación de las impurezas que se encuentran presentes en él, como son la grasa y tejido conjuntivo que no fueron eliminados en un principio. El páncreas descongelado y limpio es pasa-

do a través del molino de carne, para obtener una forma mas fina y facilitar la extracción de los zimógenos que se encuentran en el interior de las células.

En un tanque de acero inoxidable es colocado el pán-- creas molido, suspendiéndolo en 1.7 litros de agua por kg, ajus tando el PH a 4.2 con ácido acético, él cual debe estarse ajus tando cada 15' ó 30', controlando la temperatura entre 2° - 4°C, agitando por cuatro horas y manteniendo al final una hora de re poso. Durante éste proceso es importante mantener constante la temperatura, pH y la agitación, para obtener buenos rendimien-- tos.

Finalizado el tiempo de extracción, el material inso-- luble es removido con la ayuda primero de una prensa mecánica y posteriormente con una centrifuga. El liquido clarificado es -- concentrado, para éste último paso se usa un evaporador, contro lándose la temperatura y vacio los cuales no deben ser superio-- res a 38°C.

Hasta ésta parte del proceso se han extraido simultá-- neamente el quimotripsinógeno y tripsinógeno, por lo tanto la - siguiente etapa es la purificación de los mismos.

2.- PURIFICACION DE QUIMOTRIPSINOGENO

La purificación del quimotrisinógeno está basada en - la precipitación fraccionada con sulfato de amonio. El éxito de la purificación es el uso adecuado de la solubilidad, la cual -

depende de varias variables como son; pH, temperatura y concentración del electrolito en éste caso el sulfato de amonio.

Efecto del pH: El pH es un factor muy importante en la purificación del zimógeno, puesto que éste es determinante en la solubilidad de las proteínas, puesto que estas son mas solubles cuando se encuentran cargadas positiva o negativamente del punto isoeléctrico.

Para hacer uso de ésta variable en el curso de una purificación es necesario conocer los tipos de proteínas presentes asi como sus respectivos puntos isoeléctricos para proceder a la separación. Cuando dos proteínas presentan el mismo punto isoeléctrico, la separación es posible, por eliminación de la menos soluble, con una cantidad suficiente de electrolito y removiendolo como precipitado; conociéndose como precipitación -- isoeléctrica.

Efecto de la temperatura: Las proteínas en soluciones diluidas de electrolitos, son mas solubles a temperaturas mas altas de 0°C. Las proteínas en soluciones concentradas de electrolitos son menos solubles.

Efecto del tipo de electrolito empleado: Las sales univalentes son inefectivas en la precipitación de proteínas, las de mayor valencia producen mayor fuerza iónica, siendo por lo tanto, mas efectivas como agentes precipitadores de proteínas.

Una de las sales mas comunmente usadas como agente pre cipitante es el sulfato de amonio, él cual es muy soluble y fá-- cil de conseguirlo.

La forma de adicionar la sal, presenta un efecto impor-- tante en la precipitación fraccionada de las proteínas. Existen tres formas de adicionarla las cuales son: a) adicionandola en -- forma sólida, b) adicionandola en solución saturada y c) diali-- zando la sal a través de una membrana de celulosa.

El último método de adición es el mas efectivo, sin en bargo es el mas impractico. La mayoría de los investigadores --- usan en forma alternada los dos primeros métodos.

La concentración de la sal requerida para precipitar -- está referida en terminos de porciento de saturación, para obte-- ner la cantidad en gramos se recurre a tablas previamente esta-- blecidas.

Breve descripción del proceso de purificación:

En la purificación se usa el método tradicional de Ku-- nitz y Northrop (19). En ésta etapa el material necesario son: -- tanques de acero inoxidable, embudos para filtrar, papel filtro y el sulfato de amonio. El procedimiento es como sigue; Por cada litro de extracción ácida obtenida, se le agregan 242 gr de sul-- fato de amonio para tener un 0.4 por ciento de saturación y ajus tando el pH a 4.2 y agitando vigorosamente para solubilizar toda

la sal y evitando el exceso local de la misma. La mezcla a 5°C es filtrada. Al filtrado resultante se le agregan 205 gr por litro de sulfato de amonio para alcanzar una concentración de 0.7 por ciento de saturación, agitar y dejar reposar por dos días a 5°C.

Transcurrido el tiempo de reposo, filtrar y al filtrado resultante puede ser usado para la preparación de ribonucleasa. Al precipitado obtenido es disuelto en tres volúmenes de -- agua y dos volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio, la suspensión resultante es filtrada, para la cual utilizamos -- la ayuda del celite; al filtrado resultante se le agrega 205 -- g/l de sulfato de amonio lentamente. Filtrar y el precipitado -- es usado para la cristalización del Quimotripsinógeno.

Cristalización del Quimotripsinógeno: En esta fase es realmente donde ocurre la purificación del Quimotripsinógeno, -- en esta etapa es muy importante el pH ya que propiamente de él depende la separación del tripsinógeno e inhibidor de la Tripsi -- na.

El precipitado es disuelto en 1.5 volúmenes de agua -- y 0.5 volúmenes de solución de Sulfato de Amonio Saturado, ajus -- tar el pH a 5 por la adición de NaOH 5N gota a gota. La solu--- ción se deja dos días a 20-25°C. Una copiosa cosecha de crista-- les de Quimotripsinógeno es obtenida en forma de largas agujas, filtrar, en el precipitado se encuentra el Quimotripsinógeno y en el filtrado el Tripsinógeno.

Recristalización del Quimotripsinógeno: Siguiendo el método de Kunitz y Northron (19) éste es realizado con sulfato de amonio, obteniéndose buenos resultados.

Los cristales de Quimotripsinógenos obtenidos en el paso anterior, son disueltos en tres volúmenes de agua y un volumen de solución saturada de sulfato de amonio, ajustando el pH a 5. Estas recristalizaciones son repetidas por unas 8 veces, para eliminar al máximo las impurezas.

Otros autores realizan algunas modificaciones al método original de Kunitz en la purificación. Estos suspenden los cristales de Quimotripsinógeno en 5 volúmenes de agua ajustando el pH a 3 agregando el sulfato de amonio y ajustándose el pH a 4 en lugar de 5 con NaOH en estas condiciones la recristalización es completa en cerca de 30'.

III. ACTIVACION DE QUIMOTRIPSINOGENO

La activación es efectuada en las soluciones del Quimotripsinógeno a pH 7-8. Esta activación es rápidamente efectuada por la enteroquinasa, y no por pequeñas cantidades de Tripsina, puesto que la solución de Quimotripsinógeno contiene pequeñas cantidades de tripsinógeno e inhibidor de Tripsina, y por consiguiente, la tripsina es inactivada. Cuando la Enteroquinasa es agregada, suficiente tripsina es formada del tripsinógeno superando la acción inhibitoria de la solución y activando al Quimotripsinógeno. Después de una cristalización la proteína --

puede ser activada por la tripsina o enteroquinas, pero después de repetidas recristalizaciones sólo es activada por la Tripsina y no por la entoroquinasa.

Dos quimotripsinógenos A y B y varias quimotripsinas son conocidas. El primer quimotripsinógeno fué cristalizado por Kunitz y Northrop (1), varias modificaciones del procedimiento original fueron hechas por Kunitz (22,23), y el segundo quimotripsinógeno fue obtenido por Laskowsky y colaboradores (22,25).

En el proceso de activación tiene lugar la liberación o segmentación de uno o dos péptidos y dependiendo del sitio -- donde surge la segmentación, es el tipo de quimotripsina resultante.

Las diferentes formas o tipos de quimotripsina difieren; en la forma cristalina, solubilidad y velocidad de inactivación por la Urea, alcalí o ácido, no han sido encontradas diferencias en cuanto a su actividad proteolítica. Deduciéndose -- que los diferentes tipos de quimotripsina difieren en aquellos sitios de la molécula que no están relacionados con el sitio activo.

Activación de Quimotripsinógeno A: Este es convertido a enzima activa a pH 7.6 a 5°C por dos días de activación, por segmentación triptica del enlace entre Arg₁₅ - Isoleu₁₆ . Una subsecuente acción autocatalítica remueve los dipéptidos --- Ser₁₄ - Arg₁₅ para producir Quimotripsina.

La segmentación de dos o más enlaces con la eliminación de Tecmina₂₄₇ - Ars₂₄₈ conducen a Quimotripsina.

IV. PURIFICACION DE QUIMOTRIPSINA

Esta purificación es realizada por repetidas precipitaciones con Sulfato de Amonio.

La cristalización de Quimotripsina es llevada a cabo por el ajuste de pH a 4 con el ácido sulfúrico 5N y agregando el sulfato de amonio. La suspensión resultante es filtrada por papel filtro y el precipitado obtenido es disuelto en 0.75 volúmenes de ácido sulfúrico 0.01N e inculado con quimotripsina dejándola a 20°C por 24 hrs.

Recristalización de Quimotripsina: El precipitado contenido en el paso anterior es disuelto en 1.5 volúmenes de ácido sulfúrico 0.01N y cerca de un volumen de solución saturada de sulfato de amonio. Después de una hora a temperatura ambiente la cristalización comienza.

CRISTALIZACION DE δ QUIMOTRIPSINA (20)

La δ quimotripsina es disuelta en un volumen de agua y solución amortiguadora de fosfatos pH 8, dejándola en reposo por tres semanas a 5°C. Transcurrido el tiempo, se agrega solución de sulfato de amonio y el pH es ajustado a 5.6 con ácido sulfúrico 5N gota a gota, permaneciendo a 20°C por tres días. Transcurrido el tiempo, es filtrada por vacío obteniéndose lar-

gos cristales piramidales. Estos cristales son recristalizados disolviéndolos en agua y agregando sulfato de amonio saturado, obteniéndose después de 24 hrs. Los cristales de alfaquimotripsina.

CRISTALIZACION DE QUIMOTRIPSINA

La Delta quimotripsina, fue preparada primeramente -- por Jacobsen. Posteriormente Sclwert y Kaufman (38), escribie-- ron un procedimiento para obtener delta Quimotripsina, usando -- alfa.

Quimotripsinógeno recristalizado 8 veces. El Quimo--- tripsinógeno es disuelto en agua, ajustando el pH a 7.3 con --- NaOH O.I.N. a una temperatura de 0°C, después de 20' se agrega la tripsina cristalina para la activación y después de 90' el - pH de la solución es ajustado a 4.2 con ácido sulfúrico 2N y fi-- nalmente la solución es liofilizada.

QUIMOTRIPSINOGENO B

Como anteriormente se mencionó, se extraen dos Quimo-- tripsinógenos del páncreas bovino. El proceso de extracción es el mismo que para el de A, la diferencia está en el proceso de purificación el cual es como sigue: Al extracto ácido se le --- agregan 114 g/l. de sulfato de amonio, filtrándose y al filtra-- do se le agregan 121 g. de sulfato de amonio, filtrándose. En - el precipitado se encuentra el Quimotripsinógeno B y en el fil-

trado está el Tripsinógeno inhibidor de tripsina y ribonucleasa.

La cristalización y recristalización del zimógeno es realizada con sulfato de amonio.

La activación del Quimotripsinógeno B es realizada -- con tripsina a $\text{pH} = 7.6$ y 0°C , siendo segmentados los enlaces - de ARG - 15 ISO_{16} produciéndose la quimotripsina.

Bajo condiciones de lenta activación (1:2000) a pH a 7.8 y 0°C , ocurre la segmentación en $\text{Leu}_{147} - \text{A}_{148}$ en $\text{Leu}_{149} \text{ Lis}_{150}$ en $\text{Tir}_{146} - \text{Asn}_{147}$ resultando la correspondiente -- quimotripsina B (12), en la cual se encuentra la Tir 146 en posición C-Terminal y Lisina 150 en posición N Terminal.

La aislación de Quimotripsinógeno B en estado puro, - es más difícil que el A debido, principalmente, a que el Zimógeno B está en una proporción de $1/4$ con respecto al de A; el zimógeno B no cristaliza tan rápidamente como el de A; la Deoxirribonucleasa es precipitada por el sulfato de amonio mostrando similar modelo cromatográfico zimógeno B.

Durante todo el proceso de activación, es importante seguirla; realizando determinaciones de la actividad con las -- técnicas adecuadas pero éstas deben ser sencillas y rápidas. Es to es, con el objeto de verificar el proceso de la activación.

ANÁLISIS DE QUIMOTRIPSINA

El análisis de la quimotripsina es realizada por tres métodos diferentes.

1.- El análisis de la quimotripsina, como proteína de terminando su absorción a 280 nm. Este método fué introducido - por Kunitz; la enzima es disuelta en ácido clorhídrico para dar nos una concentración final de 0.1 a 0.35 mg/ml y determinando la absorbancia a 280 nm. el método es sumamente sencillo y práctico, pero presenta algunas inconveniencias como son: a) la enzima debe estar libre de contaminantes que absorban a 280 nm y b) con éste método se determina la cantidad de proteína presente, pero no la actividad enzimática. este método es utilizado - principalmente en el curso de una purificación.

2.- La quimotripsina tiene actividad amidasa y esterasa, por lo tanto la actividad enzimática es determinada usando aquellas características. Para realizar la actividad enzimática se utilizan dos tipos de sustratos:

Sustratos naturales

Sustratos Sintéticos

Utilización de sustratos sintéticos: Para éste caso - se usan proteínas naturales como son la caseína y la leche. La determinación está basada en la velocidad proteolítica de la enzima. Con estos sustratos la quimotripsina tiene mas enlaces --

peptídicos susceptibles de hidrolizar, por lo tanto no hay especificidad.

El método representativo para este tipo de sustratos, es el espectrofotométrico de Kunitz, el cual la caseína como sustrato; una suspensión de caseína al 10% es preparada en Buffer de Boratos pH 7.4 adicionado de CaCl_2 , esta suspensión es puesta en baño maría hirviente por 15', después de este tiempo se deja enfriar, se ajusta el pH 7.4 está lista para la determinación. En un baño maría previamente controlado a $+37^\circ\text{C}$ se colocan los tubos conteniendo la caseína, posteriormente se agrega la solución de la enzima dejándose reaccionar por unos 20'. La reacción enzimática es detenida por la adición de ácido tricloroacético al 5% precipitándose la proteína que no fue hidrolizada por la enzima, filtrándose y el filtrado correspondiente por métodos espectrofotométricos a 280 nm., usando una curva standard y un blanco. Este método no presenta especificidad.

Otro sustrato natural es la leche, este método está basado en la capacidad que tiene la quimotripsina para coagular la leche, capacidad que la hace responsable del nombre siendo además, la diferencia principal con respecto a la tripsina.

La coagulación de la leche está determinada por el tiempo el cual bajo las condiciones adecuadas de temperaturas, pH, éste es inversamente proporcional a la concentración de la enzima agregada a la leche.

UTILIZACION DE SUSTRATOS SINTETICOS:

La introducción de sustratos sintéticos es debida a Bergman y colaboradores. En el uso de estos sustratos hay un enlace susceptible de acción enzimática, siendo usados los esterres o amidas de los aminoácidos aromáticos. Los esterres están bloqueados en el N Terminal presentando ventajas sobre las correspondientes amidas, las cuales presentan valores de Km. más bajos y además sus productos de reacción son más difíciles de cuantificar.

Determinación de la Actividad Esterasa de Quimotripsina:

Ecuación general de un Ester:



X es un grupo bloqueador tal como Acetil, Benzoil, Tosil, Benzil Oxicarbinol.

R es una cadena lateral que encuentra los requerimientos específicos para la enzima.

R' es un metil, etil, p-Nitrofenil

Los sustituyentes del sustrato tienen influencia en el acoplamiento de enzima, ya que presenta un impedimento estérico.

En la hidrólisis de los esterres, la enzima actúa por

un mecanismo de doble desplazamiento (7,11), en el cual la enzima es primero acilada y el intermediario acilado es hidrolizado a los productos correspondientes y la enzima es deacilada. Esta acilación de la enzima es comprobada por métodos espectrofotométricos y observaciones cinéticas.

Para determinar la actividad esterasa se usan métodos 1) Potenciométricos y, 2) Espectrométricos con: a) Rango en el ultravioleta y b) Rango en el visible.

Métodos Potenciométricos: Están basados en la liberación continua de grupos carboxilo en la hidrólisis de los ésteres correspondientes, la cuantificación es llevada a cabo en potenciómetro y a una temperatura de 25°C. El pH inicial es registrado conforme va realizándose la reacción enzimática, el pH es ajustado continuamente con NaOH 0.02N. Al final del tiempo tendremos los ml. de NaOH consumidos para mantener el pH constante. Los ml. de NaOH gastados están en función de los grupos Carboxilo producidos en la hidrólisis.

Para este método los sustratos usados son: N-Acetil - Tirosina Etil Ester (ATEE), en una concentración de 0.018 M la concentración de la enzima es del orden de 2 mg/100 ml. La cinética de la reacción es de primer orden por lo tanto la concentración del sustrato es crítica.

Otro sustrato usado es L-Tirosina Etil (TEE) con una concentración de 0.025 M, la cantidad de enzima debe ser calculada para causar una liberación de 0.005 meq de grupos carboxi-

lo/Minuto. El pH es mantenido en 6.25 por la adición de NaOH --
0.02 N, después de un tiempo determinado se grafican los ml. de
NaOH contra el tiempo, obteniéndose una reacción de cero orden.

Otros sustratos típicos son: Carbobenzoxil-Tirosina -
Etil Ester L-Fenil Alanina Etil Ester y Acetil-Fenil Alanina --
Etil-Ester.

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Estos métodos están basados en las diferencias de absorción de la enzima, sustrato y los productos de la hidrólisis, y la longitud de onda seleccionada.

En las determinaciones Espectrofotométricas en las -- cuales se usa el rango ultravioleta, los sustratos usados son -- los aromáticos. Para este tipo de determinación se emplea un es pectro con graficador y un adaptador para mantener la temperatu ra constante dentro de las celdas donde se verifica la reacción. El sustrato de elección se disuelve en solución amortiguadora -- de 0.10 M pH 7.8 el cual contiene CaCl_2 0.I.M. se pone la enzi-- ma disuelta en HCL 0.001 M a una concentración de 1 mg/ML. Ini-- cialmente tomar la lectura de la absorbancia sin la enzima y en el momento de agregar ésta se toma como tiempo cero. Siguiendo el curso de la reacción se registran las diferencias de absor-- bancia a 256 nm. cada 30'' por un lapso de 5'.

Para calcular las Unidades de enzima presente, sólo -- es necesario graficar las absorbancias contra el tiempo, tomar-- do solo en cuenta los puntos de la recta. Al restar la absorban-- cia mayor de la menor, tenemos la absorbancia que dividida por el tiempo una constante y la concentración de la enzima, tene-- mos las unidades de la enzima.

Los sustratos más comunmente usados para los rangos --

ultravioleta son: N-Benzoil-L Tirosina Ester (BTEE), N-Benziloxicar binol-L Tirosina p-Nitro Fenil Ester (1.2×10^{-3} mg/n).

L-Tirosina Etil Ester (TEE), N, Acetil-L-Tirosina --- Etil Ester, Cabobenzoxi -L Tirosina Etil Ester, L-Fenil Alanina Ester, Acetil-L-Fenil Alanina Etil Ester.

Determinación Espectrofotométrica por Métodos Colorimétricos: Este esta basado en la formación de un compuesto colorido que es cuantificado, determinando la absorbancia en el rango del visible. La formación de este compuesto colorido es el resultado de la reacción de los productos de hidrólisis originados por la enzima y del compuesto cromógeno. Para esta determinación se sigue el curso de la reacción enzimática en las celdas de reacción, en las cuales se ha colocado el sustrato de elección disuelto en el Buffer, la solución de la enzima y el compuesto cromógeno. Como sustrato tenemos el N-Benzoil-Di Fenil Alanina Beta Naftil Ester, el resultado de la hidrólisis es el Diorto Anisida Tetrazolizado que es cromógeno, resultando el compuesto colorido el cual es extraído con acetato de etilo y determinado colorimétricamente.

Hay un método manométrico para la determinación de la actividad esterasa de la Quimotripsina, el cual está basado en diferencia del volumen producido por el incremento de CO_2 , proveniente del Carbonato al ensayo es realizado en recipientes especiales en el cual encuentra el sustrato que para este fin es

L-Fenil Alanina Etil Ester Clorhidratos (FEE), en una concentración de 0.025 M conteniendo una solución de bicarbonato de sodio 0.042 M más la solución de la enzima, la cual es agregada con micropipeta, controlando la temperatura y el tiempo. La velocidad de evolución del CO_2 es proporcional a la concentración de la enzima.

Determinaciones Espectrofotométricas utilizando el rango visible: La alfa quimotripsina cataliza la hidrólisis de N Alfa Acetil Triptófano Ester (S), el cual es usado como un nuevo sustrato cromogénico. La hidrólisis del sustrato es cuantificada por un procedimiento colorimétrico, determinando la absorbancia máxima a 352 nm. por la transformación del ester al correspondiente ácido. Para este tipo de cuantificación la concentración del sustrato es de 0.05-0.001 M y de la enzima de 0.00001-0,0000001 M a un pH de 8; uno de los compuestos más usados es Metil-Metil - 3,4 - Dihidro Carbolina-3 Carboxilato (es un derivado de Beta Carbolina).

Erlanger (9.18), introduce N-Gluteril-Fenilalanina-Nitroanilina (l-GPNA), un nuevo sustrato. En la celda de reacción se pone el sustrato y la enzima en buffer pH 7.6. Para detener la reacción se usa Acido Tricloro Acético. El resultado de la hidrólisis es la liberación de Nitroanilida, la cual es de un color amarillo y es determinado colorimétricamente, determinando su máximo de absorción.

Recientemente se han encontrado que los tioles ésteres son hidrolizados por la quimotripsina (10). El Benzoil-Tirosina tiobenzil éster. La hidrólisis es determinada por la liberación de benzil mercaptano que reacciona directamente con 5.5' Ditiol (2-Ac Nitrobenzoico) formando un compuesto colorido y determinando su absorbancia a 410 mμ. (Es un compuesto cromogénico). El Tiobenzil es un compuesto mucho más estable hacia la hidrólisis a pH alcalinos. En la celda se coloca la solución buffer --- Tris a pH 7.8 el sustrato disuelto en Acetona más el reactivo -- 5.5' -Diotibis (2-Ac Nitrobenzoico), la solución de Quimotripsina 0.5 ml. (1.36×10^{-3} mg/ml). La celda es colocada a temperatura de 30°C siguiendo el curso de la reacción por un tiempo determinado.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMIDASA DE LA QUIMOTRIPSINA:

En la determinación de la actividad Amidasa, hay métodos basados en la titulación ácido-básica, métodos Espectrofotométricos y los Fluorogénicos.

Los métodos de las titulaciones ácido-base, están basados en la liberación del Amoniaco, producto de la hidrólisis del sustrato y la enzima, el Amoniaco liberado es titulado con HCL 0.01N, usando como indicador una gota de tashiro.

El procedimiento es muy sencillo: En una cámara especial, se colocan cantidades iguales de Enzima y Sustrato que para este caso es la glicil-Fenil Alaninamida y Acetil Tirosamida, en solución amortiguadora a 25°C, y un blanco. Se debe tomar en cuenta que 0.01 ml. de HCL corresponde a 1% de la hidrólisis.

Dentro de los Métodos Espectrofotométricos: tenemos a los métodos colorimétricos. La Quimotripsina cataliza la hidrólisis de las formas ciclohidratadas de N-Acetil triptofano Amida (5) la cual es usada como un nuevo sustrato cromogenico, la hidrólisis del sustrato es determinada cuantificando la absorban-
cia máxima a 353 mn. siendo la concentración del sustrato de --
0.001-0.000001M y la concentración de la enzima es 0.0001M a --
0.0000001M a un pH de 8 y a 25°C.

Las nitroanilidas han sido usadas como sustratos cromogénicos, para la actividad Amidasa de la Quimotripsina: ejem. La Glutaril Fenilalanina-Nitroanilida.

Métodos Fluorogénicos: Se usa un sustrato cromogénico para determinar la actividad Amidasa (44,45) siendo 7-Glutaril Fenil Alaninamida-4-Metil Cumarina, con la consecuente liberación de 7-Amino-4-Metil Cumarina, la cual es determinada fluorométricamente usando tan solo 0.5 Mg/ml. de un pH de 8. El sustrato es específico para Quimotripsina, puesto que no es hidrolizado por la Tripsina.

Las Amidás derivadas de la Cumarina son útiles ya que los derivados de la hidrólisis son compuestos fluorescentes.

Procedimiento: el ensayo se lleva a cabo conteniendo el Sustrato 0.02 M en buffer Tris a un pH de 8 el cual contiene CaCl_2 siendo el volumen final de 1 ml. de la concentración de la enzima que es de 0.5 mcg/ml., la reacción es de 1-3'. La Fluorecencia del 7-Amino-4-Metil cumarina es registrada continuamente usando un espectrofluorometro con emisión a 380 y 460 nm. El instrumento es estandarizado diariamente tal que 1.35 mcg. de solución de Sulfato de Quinina en ácido sulfúrico 0.1 M den una Unidad de Fluorecencia relativa.

El uso de Sustratos sintéticos proporcionan mejores resultados en comparación con los naturales, puesto que en los sintéticos sólo hay un enlace susceptible de atacar la enzima -- por lo que, se tornan altamente específicos, pero se debe tener cuidado en la elección del sustrato ya que algunos son hidrolizados por la Tripsina y Quimotripsina, como por ejemplo: El Boj

zoil-L-Arginina metil ester es específico para tripsina pero, -- también es susceptible a la hidrólisis de (delta) Quimotripsina.

El uso de Sustratos Sintéticos es muy útil cuando se -- requiere conocer el grado de contaminación con alguna otra enzi-- ma.

USOS DE QUIMOTRIPSINA:

En la actualidad dentro de la Industria Farmacéutica -- presenta una gran aplicación, es difícil encontrarla en forma in-- dividua, la mayoría de las presentaciones se encuentra unida a otras enzimas principalmente a la Tripsina y Ribonucleasa, encon-- trándose también combinada con algunos Antibióticos, sobre todo con la Tetraciclina, Ampicilina, Clorafenicol, etc.

La Quimotripsina se ha usado con éxito en los procesos bromconeumónicos del infante (31). Esto se ha demostrado usando dos grupos de pacientes: A) Grupo uno el cual es tratado con Qui-- motripsina inyectable en dosis pediátrica cada 12 hrs., B) Gru-- po dos al cual no es aplicada la Quimotripsina, ambos grupos son tratados con el procedimiento normal para la bronconeumonía con-- sistente en la aplicación del antibiótico de elección (penicili-- na sódica) un ambiente húmedo y control de la temperatura por me-- dios físicos.

Resultado: hay una disminución del tiempo de duración de la enfermedad en un 30% del grupo tratado con Quimotripsina.

mejor dicho, la evolución en el tratamiento de la enfermedad es más rápida y mejor en el grupo tratado con Quimotripsina.

La forma de actuar de la Quimotripsina en estos procesos es de la siguiente forma: cuando el agente causante de la Bronconeumonía (microorganismos, agentes tóxicos) llega al alveolo produce una inflamación con el consecuente exudado, congestión sanguínea e invalidéz del área inflamada. La Quimotripsina inhibe la formación de la fibrina lo que permite el egreso del exudado líquido celular al interior del vaso. Concluyéndose, que la Quimotripsina es útil como coadyuvante en el tratamiento de los procesos Bronconeumónicos.

El uso de Quimotripsina combinada con un antibiótico es útil en el tratamiento de las infecciones de carácter urológico (39) usándose con éxito en los procesos agudos y crónicos. Se realizaron estudios clínicos usando la asociación Quimotripsina Clorhidrato de Teatraciclina, con el objeto de valorar los efectos en los tratamientos de cuadros patológicos de carácter urológico, realizándose el estudio en pacientes con infección urinaria, pacientes que han sufrido intervención Quirúrgica urg lógica pacientes que presentan una grave Bacteriuria crónica re sistente a la mayor parte de los antibióticos de uso frecuente.

El producto es suministrado en dosis de 4 cápsulas -- diarias por un período de 15 días. Durante el período del trata miento, los pacientes no presentan intolerancia o fenómenos colu

terales. Concluyéndose que la asociación Antibiótico-Enzima permite obtener resultados rápidos y válidos en los casos de terapia antiflogística y antibacteriana en afecciones de tipo urológico.

En México se realizaron estudios en las infecciones -pélvico genitales, usando un tratamiento en base a la asociación Antibiotico Enzima (13), observándose mejores resultados - usando este tratamiento con respecto al normal, éste consiste - solamente en la administración del antibiótico, pero después -- del tratamiento aparece una secuela inherente a la inflamación, - la cual, puede provocar problemas como es la esterilidad prima- ria o secundaria, embarazos ectópicos y la utilización de Quimo tripsina disminuye la posibilidad de estas secuelas posteriores.

Con la asociación Antibiotico-Quimotripsina permite - sanar los procesos infecciosos íntegramente, ya que actúa sobre los gérmenes y la infección.

Se realizaron estudios en pacientes con infecciones -pélvico genitales, administrando cápsulas cada 6 hrs. conteniendo:

Clorhidrato de Tetraciclina.....	125 mg.
Ac. Cítrico	60 mg.
Tripsina	20.2 mg.
Quimotripsina	6.45 mg.
Ribonucleasa	0.5 mg.

Seneca y Peer opinan que la absorción de la tetraciclina a través del tracto intestinal aumenta cuando se asocian las enzimas, por lo tanto el antibiótico presenta mayores niveles -- sanguíneos. La ribonucleasa contribuye a la actividad antiinflamatoria. El ácido cítrico según Welch y Coles, favorece la absorción intestinal del antibiótico hasta en un 100% permitiendo altas concentraciones sanguíneas del mismo, con lo cual disminuye la posibilidad de creación de resistencia del fármaco por parte del germen causante. La alta incidencia de los éxitos obtenidos permite concluir que es efectiva la sinergia de los fármacos usados, siendo por lo tanto recomendados en las infecciones ginecológicas.

La asociación Antibiótico-Enzima proporciona una actividad terapéutica antibacteriana y antiflogística, aprovechándose el hecho de que la Quimotripsina desarrolla su acción antiflogística en el organismo sin interferir en la capacidad de defensa del organismo como hacen otros productos antiflogísticos.

Otra de las ventajas de la asociación, es la disminución de los efectos tóxicos-alérgicos y Biológicos, debidos a -- los antibióticos suministrados en dosis reducidas.

Una ventaja más de esta asociación es que, en los procesos infecciosos el paciente presenta un exudado muy elevado, -- por lo que es difícil la acción del antibiótico y en la asociación la enzima interviene lisando las cápsulas Fibrino-Purulen--

tas, permitiendo la acción del antibiótico.

Prueter y sus colaboradores trataron 60 pacientes con supuraciones crónicas y agudas con Quimotripsina disuelta en solución amortiguadora o en gel de carboximetil celulosa al 4.5%. La solución es aplicada directamente en la herida. La superficie de la herida queda libre de la pus y tejido necrótico dentro de las 48 72 hrs. y úlceras profundas en cerca de 5 días.

Hay muchas teorías con respecto a la forma de acción en los procesos de inflamación.

Altrei A opina que la acción antiflogística de la Quimotripsina consiste en un antagonismo hacia las Quininas vasoactivas como la bradiquinina que son consideradas las responsables de la persistencia de las alteraciones circulatorias del tejido inflamado.

Innerfield sostiene que la acción antiinflamatoria de la Quimotripsina esta determinada por la despolarización de las moléculas proteicas de pesos moleculares altos por la reducción de la viscosidad de los fluidos encapsulados y de los productos de secreción. En un proceso de inflamación hay exudado, congestión sanguínea e invalidéz del área inflamada. Al llegar la quimotripsina al sitio de la inflamación, inhibe la formación de fibrina la que permite el regreso del exudado líquido y celular al interior del vaso disminuyendo la presión oncótica intersticial que antes comprimía a los vasos.

En la reducción de la viscosidad sucede que la Quinotripsina actúa sobre las proteínas íntegras segmentándolas hasta Aminoácidos, disminuyendo por lo tanto la viscosidad del exu dado y favoreciendo la absorción.

PROPIEDADES DE TRIPSIINA

La Tripsina se presenta en forma de polvo cristalino o polvo amorfo, de color blanco o blanco amarillento con olor - característico.

Pureza: Contiene no menos de 2500 UNF/mg

Solubilidad: Completamente soluble en agua y solución salina.

Humedad: Siguiendo el método de secado al vacío a 60°C durante 4 horas, contiene no más del 5%.

Residuo de la Ignición: No más del 2.5%

Punto Isoeléctrico: Determinado por el método de la - velocidad de migración de las par - tículas de colodión sumergidas las soluciones de enzima a diferentes pH, para la Tripsina es de 11 y - para el Tripsinógeno de 9.3

Coefficiente de Difusión: Determinado en solución saturada de sulfato de magnesio es de 0.020 ± 0.001 cm/día a 5°C.

Peso molecular: Es aproximadamente de 24000.0

Estabilidad: Presenta un pH de máxima estabilidad de 3, siendo conservadas sus soluciones a

bajas temperaturas sin pérdida de la actividad.

La inactivación de la Tripsina depende de varios factores, como son la temperatura, pH , concentración y pureza de la solución, esta inactivación es reversible e irreversible. La reversible es causada por la elevaciones de la temperatura arriba de $70^{\circ}C$ ó en soluciones fuertemente alcalinas por un tiempo muy corto, el efecto es instantáneo; esta pérdida de la actividad es acompañada por la presencia de proteína desnaturizada, la cual presenta propiedades físicas diferentes a la original, como por ejemplo la proteína desnaturizada es insoluble en soluciones de sal a $pH = 2$ (la proteína original es soluble en estas condiciones).

La inactivación Irreversible es causada por la elevación de la temperatura y la exposición de tiempo. Prolongando esta inactivación también es causada por la presencia de sustancias desnaturizantes como la Urea a una concentración de 4 M.

La adición de iones Calcio a las soluciones de Tripsina previenen o retardan la autólisis. Este efecto estabilizante es acompañado por un cambio conformacional en la molécula de la tripsina inducida por los iones Calcio dando como resultado una molécula más compacta.

OBTENCION DE TRIPSIINA

La mayoría de los métodos reportados, estan basados - en extracciones de productos naturales y posteriormente una activación y finalmente precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio para su purificación.

Las diferentes Industrias que obtienen la tripsina, - siguen el método tradicional de Kunitz y Northrop, los cuales - fueron los que inicialmente la aislaron en forma pura. Estas In dustrias realizan algunas modificaciones en las técnicas origi- nales, para obtener mejores rendimientos.

La principal fuente de obtención es el páncreas, en - el cual está en forma inactiva, siendo posteriormente activada en el intestino por una enzima la enteroquinasa. Activada la -- tripsina es como realiza las diferentes funciones en el organis- mo.

Los diferentes estudios de obtención fuerón realiza-- dos en páncreas de diferentes animales tales como; res, cerdo, caballo, salmón, pollo, tiburón pequeño etc. Todos estos estu-- dios fuerón a nivel de laboratorio. Para fines Industriales es mas práctico trabajar con páncreas bovino y porcino siendo en - México mas fácil conseguir estos últimos.

El páncreas bovino es obtenido directamente de los lu gares donde son sacrificados los animales, como por ejemplo la

central de Abastos. En estos lugares los animales son sacrificados seleccionándose las vísceras usadas en las diferentes industrias que las soliciten, éstas son inmediatamente refrigeradas para eliminar toda la grasa y demás tejidos y ya en esta forma ser envasadas en cajas especiales para ser congeladas para posteriormente ser distribuidas en las diferentes industrias que las soliciten.

En el proceso de extracción de la Tripsina se siguen varias etapas, que son:

- 1.- EXTRACCION DEL TRIPSINOGENO
- 2.- PURIFICACION DEL TRIPSINOGENO
- 3.- ACTIVACION DEL TRIPSINOGENO
- 4.- PURIFICACION DE TRIPSINA

1.- EXTRACCION DEL TRIPSINOGENO

Como fue mencionado anteriormente, la Tripsina se encuentra en el Páncreas en forma inactiva, llamada Tripsinógeno, por consiguiente la primera etapa es la extracción de éste.

El tripsinógeno es una proteína con características propias de ésta, usándose las constantes físicas del zimógeno para el proceso de extracción.

El páncreas para facilitar la extracción se debe encontrar en forma fina, lográndose esto usando la carne molida, el cual es logrado usando un molino de carne normal. Una vez en

esta forma es necesario romper la célula, para dejar en libertad al zimógeno. Para lograr esto último se conocen varios métodos -- como son: Agitación a altas velocidades con cuentas de vidrio, -- moliendo el páncreas con arena, oscilaciones ultrasónicas, con-- gelamiento y descongelamiento, tratamientos con solventes tales como acetona, tolueno o la lisis por medio de una enzima. De to dos los métodos mencionados el más recomendado por práctico es la agitación constante con la adición de tolueno.

Una vez que el zimógeno se encuentra en solución, es -- necesario el ajuste del pH, el cual es logrado por la adición de ácido acético o ácido sulfúrico 0.25 N. Este pH debe ser aquel -- en el cual las proteínas que interesan extraer sean solubles y -- estables. Otra variable que se controla en esta etapa es la temperatura que debe de ser baja, para proteger las propiedades de las proteínas presentes y además favorecer la solubilidad, este ajuste de la temperatura es logrado por el uso de tanques de ace ro inoxidable con chaqueta por la cual circula un líquido frío, como por ejemplo: el agua salmuera.

El equipo y material usado en esta etapa son: Tanques de acero inoxidable con chaqueta provistos de agitadores mecánicos, bomba de retroalimentación, charolas de acero inoxidable ap lino de carne, prensa mecánica centrífuga, evaporador, bomba de vacío, torre de enfriamiento, refrigerador, congelador páncreas, ácido sulfúrico 0.25 N, ácido acético y tolueno.

Breve descripción del proceso:

El procedimiento es el tradicional usado por Kunitz y Northrop (19) con la variante de usar el páncreas congelado en lugar del fresco, puesto que en la última forma es difícil conseguirlo. El páncreas es colocado en las charolas de acero inoxidable, sumergiéndolo completamente en el ácido sulfúrico y dejándolo descongelar en una forma natural, evitando los procedimientos artificiales como son el uso de lámparas. Después de transcurrido el tiempo necesario para el descongelamiento se procede a la eliminación de la grasa y tejido conjuntivo que está presente en el Páncreas, posteriormente la carne es pasada a través del molino de carne para obtener una forma más fina de ésta.

El páncreas molido es colocado en el tanque de acero inoxidable, suspendiéndolo en agua usando aproximadamente 1.7 l/kg. de carne, ajustándose el pH a 4.2 con ácido acético o sulfúrico Este ajuste de pH debe realizarse cada 15 o 30 minutos por 4 horas. (el tiempo de extracción se verifica dependiendo de los resultados obtenidos en los desechos) controlándose la temperatura entre 2 y 4°C manteniendo alternada agitación con tiempo de reposo adicionándose tolueno al tanque de extracción.

El éxito de la extracción depende de variables como son la temperatura, pH y agitación, por lo tanto es necesario mantener constantes estos factores.

Transcurrido el tiempo necesario de extracción, eliminar todo el material insoluble presente, ésto es logrado haciendo pasar la suspensión a través de una prensa mecánica, la cual tiene propiamente dos funciones: a) Eliminar el material insoluble, b) Extraer al máximo las proteínas de la carne. Posteriormente la suspensión es pasada a través de una centrífuga para - ayudar a la eliminación total del material insoluble, obteniéndose un líquido más claro.

Finalmente se pasa a la eliminación del exceso de --- agua, puesto que es más fácil trabajar con pequeños volúmenes. Esta eliminación se realiza en un evaporador con la ayuda de -- una bomba de vacío y un sistema de enfriamiento. El líquido obtenido en la etapa anterior es colocado en el recipiente adecuado y por medio de vapor es llevado a 38°C usando vacío para controlar la temperatura de ebullición. Normalmente la eliminación del agua es del 50% del volumen total.

Hasta esta etapa del proceso se han extraído simultáneamente el Tripsinógeno y Quimotripsinógeno, por lo tanto, la siguiente etapa es la purificación del Tripsinógeno.

2.- PURIFICACION DEL TRIPSINOGENO

La purificación del Tripsinógeno está basada en la -- precipitación fraccionada con sales neutras, estas sales actúan por medio de la descarga de la partícula y de la deshidratación de la capa que envuelve a la proteína. Entre lo más común terse-

mos al Sulfato de Amonio, el cual es usado por su alta solubilidad en agua cercana a 760 g/L a 20°C. Otras de las sales usadas son $MgSO_4$ y Na_2SO_4 , estas sales son consideradas como agentes precipitantes y tienen la ventaja adicional de estabilizar a las proteínas en solución, impidiendo la desnaturalización.

Esta precipitación se explica de la siguiente forma:

El Tripsinógeno es una proteína, por consiguiente es una molécula de gran tamaño y caen dentro de los límites del sistema coloidal. Esta proteína presenta carga eléctrica proveniente de los residuos de los aminoácidos que la componen, los radicales laterales y los de los grupos libres de Amino y Carboxilo en los extremos de la cadena del polipéptido. Estas cargas eléctricas de acuerdo con el pH de la solución presentan una carga neta positiva o negativa; bajo esta forma las proteínas permanecen en solución por repulsión entre las partículas, ya que presentan la misma carga permitiendo que el sistema permanezca estable. Cuando se utiliza el punto isoeléctrico de la proteína la repulsión entre las partículas está al mínimo, por lo tanto bajo estas condiciones se pueden precipitar con mayor facilidad. Además las proteínas presentan marcadas características hidrofílicas por lo que siempre están rodeadas de una molécula de agua y por lo tanto el fenómeno de precipitación va aunado al de la deshidratación.

Las proteínas son precipitadas por grandes cantidades

de electrolito, siendo debida a la eliminación de la capa protectora de agua y la carga eléctrica que mantiene a la proteína en solución en los cuales se requieren grandes cantidades de -- electrolito por que éste entra en competencia con el agua que rodea a la proteína y con el exceso reemplaza al agua que rodea a la partícula.

Breve descripción del método de purificación del Tripsinógeno:

La clásica purificación del Tripsinógeno es realizada por el método tradicional de Kunitz y Northrop (19.32) utilizando una precipitación con sulfato de amonio.

En esta etapa, el equipo y materiales necesarios es -- el siguiente: Tanques de acero inoxidable, papel filtro y sulfato de amonio.

De la extracción ácida obtenida en la etapa anterior, agregar 242 g/l de sulfato de amonio (0.4 de saturación) ajustándose el pH a 4.2 y agitándose vigorosamente para solubilizar toda la sal y evitar el exceso local de la misma. La mezcla es filtrada a través de papel filtro a 5°C y al filtrado resultante se le agregan 250 g/l de sulfato de amonio, agitando vigorosamente y dejando en reposo por dos días a 5°C, después de este tiempo filtrar y el precipitado obtenido es disuelto en tres volúmenes de agua y dos volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio, la solución resultante es filtrada con ayuda de celite, al filtrado resultante se le agregan 205 g/L de sulfato de

amonio lentamente; filtrar y el precipitado es usado para la purificación del Tripsinógeno.

El precipitado obtenido es disuelto en 1.5 volúmenes de agua y 0.5 volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio. Ajustar el pH a 5 por la adición de NaOH 5N gota (esta fase es importante el ajuste del pH, ya que de él depende la separación de las proteínas presentes). La solución se deja por dos días a 20 - 25°C, después de este tiempo se filtra y en el filtrado se encuentra el tripsinógeno.

CRISTALIZACION DEL TRIPSINOGENO

El filtrado obtenido en el paso anterior es ajustado a pH 3 por la adición de ácido sulfúrico 5N y agregando 304 g/L de sulfato de amonio. Filtrar, y el precipitado obtenido es disuelto en tres volúmenes de agua y dos volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio. La mezcla es filtrada con la ayuda de vacío y el precipitado es lavado con sulfato de amonio 0.4 - de saturación y siendo descartado. Al filtrado se le agrega un volumen de solución saturada de sulfato de amonio, filtrar con ayuda de vacío y el precipitado obtenido es lavado con una solución de sulfato de magnesio disuelto en ácido sulfúrico 0.02 N. El precipitado obtenido es el Tripsinógeno crudo el cual es usado para la activación a Tripsina.

3.- ACTIVACION DE TRIPSINOGENO

La activación es un proceso por medio del cual el ---

Tripsinógeno es convertido a Tripsina, éste es un proceso proteolítico realizado por la misma Tripsina ó la enteroquinasa ó la quinasa de un hongo del género penicilium (2).

Los primeros trabajos relacionados a la activación del zimógeno fueron descritos por Kunitz y Northrop (33) usando como agente activador a la enteroquinasa extraída del duodeno del cerdo, esta enzima presenta su rango de acción a pH 6-9 bajo estas condiciones la enteroquinasa actúa sobre el tripsinógeno formándose pequeñas cantidades de Tripsina, la cual es la que interviene finalmente en la activación. Kunitz y Northrop observaron que durante el proceso de activación es formada proteína inerte, la cual no es transformada a proteína activa por algunos de los activadores. La formación de esta proteína inerte es minimizada trabajando a un pH más baja de 5.5 -6°C agregando al tanque de activación iones de Calcio y ajustando el pH a 8. La autólisis de la Tripsina es minimizada usando soluciones diluídas de Tripsinógeno y empleando temperaturas no mayores de 5°C.

En el proceso de activación hay liberación o remoción de péptidos de su sitio original del Tripsinógeno (8.34) el cual es demostrado tomando muestras durante este proceso y comparándolas con patrones de Tripsina y Tripsinógeno puros con cromatografía. Hay evidencias de la liberación de un hexapéptido con la siguiente estructura Val-(asp)₄-lis el cual es for-

mado por la ruptura del enlace Lisina₆ - Isoleucina de la región N-terminal de la molécula.

Breve Descripción del proceso de activación

Se realiza de acuerdo con el método tradicional en Kunitz y Northrop (22) en el cual usaron tripsinógeno, el cual es activado con enterocquinasa o tripsina obteniéndose la enzima en forma activa. Mac Donald y Kunitz (28) observaron que con el método anterior la producción de enzima activa era muy escasa por lo tanto introdujeron iones de calcio a la mezcla de activación para mejorar la producción. El método consiste en lo siguiente: el tripsinógeno crudo es disuelto en cuatro volúmenes de ácido clorhídrico 0.005N, esta solución es agregada a dos volúmenes de cloruro de calcio previamente enfriado y 5 volúmenes de cloruro de calcio previamente enfriado por 24 hrs. En el cuarto frío. La solución es filtrada y el precipitado es desechado, el filtrado es ajustado a pH 3 con ácido sulfúrico 5N, posteriormente se le agregan 242 g/L de sulfato de amonio (0.4 de saturación) dejándose la mezcla en el cuarto frío durante dos días, obteniéndose cristales de sulfato de calcio que son eliminados por filtración y el filtrado es llevado a 0.7 de saturación por adición de 205 g/L de sulfato de amonio y filtrándose con vacío. El filtrado es desechado y el precipitado disuelto en tres volúmenes de agua destilada y la Tripsina es reprecipitada por la

adición lenta de sulfato de amonio en solución saturada gota a gota, agitándola constantemente. La mezcla es filtrada y el precipitado es lavado con sulfato de magnesio en ácido sulfúrico - 0.02N para remover el exceso de sulfato de amonio.

El precipitado es disuelto en buffer de boratos pH 9 en baño de hielo, apareciendo inmediatamente finas agujas de Tripsina, esta mezcla se deja reposar durante 24 hrs. En el cuarto frío, después de las cuales es filtrada y los cristales obtenidos son lavados con sulfato de magnesio en buffer de boratos pH 8. El licor madre y los lavados de cristalización de tripsina y el precipitado semiseco es disuelto en ácido sulfúrico 0.02N, evitándose la formación de espuma y filtrado por vacío y lavándose posteriormente.

4.- PURIFICACION DE TRIPSINA

La purificación de la Tripsina es con el objeto de incrementar la actividad específica, ésta baja debido a algunas impurezas y se eleva a un máximo valor por repetidas recristalizaciones. La purificación también puede ser llevada a cabo por afinidad cromatográfica sobre fenil butil amina safarosa y benzamidina celulosa (16). La pureza de la tripsina es comprobada utilizando péptidos específicos para determinar su actividad.

Otro método de purificación es la diálisis, la cual es un procedimiento utilizada para purificar la tripsina por la remoción o intercambio de contaminantes de bajo peso molecular,

para este procedimiento hay que tomar en cuenta la naturaleza de la membrana de diálisis y su selectividad, lo que significa su habilidad para permitir el libre flujo al exterior de los contaminantes mientras que retiene todos los contaminantes de alto peso molecular. Las membranas de diálisis están en la forma de un film delgado de sustancias altamente polimerizadas las cuales en presencia de solvente se hinchan para formar un tamiz molecular cuyos poros permiten el paso del soluto de bajo peso molecular, reteniendo el paso de las proteínas; estas membranas son químicamente inertes y sin cargas siendo usadas membranas de animales, coloidones y coloides depositados en marmita porosa y polietileno.

La diálisis es esencialmente un proceso de difusión controlada y por lo tanto, para dializar grandes volúmenes es recomendable usar la diálisis contra corriente.

ANÁLISIS DE TRIPSINA

El análisis de la tripsina está basado en la determinación de los productos de reacción obtenidos como resultado de la actividad enzimática de la Tripsina y el sustrado de elección. Estas determinaciones son realizadas por métodos espectrofotométricos y potenciométricos.

Los sustratos usados para el análisis de la tripsina son los naturales y los sintéticos; dentro de los de origen natural se encuentran las proteínas, como por ejemplo: la caseína y la hemoglobina, éstas proteínas son desnaturalizadas previamente y en esta forma son usadas para la reacción enzimática.

La caseína es desnaturalizada en baño hirviente por 15', la solución de caseína desnaturalizada (1%) es puesta a reaccionar con la tripsina a 37°C por 20', después de transcurrido el tiempo, la reacción es detenida con ácido tricloroacético al 5% precipitándose la proteína que no fue digerida por la enzima. La suspensión es filtrada y en el filtrado se encuentra el producto de la reacción el cual es determinado espectrofotométricamente a 280 nm. Los valores obtenidos son interpolados en una curva standard la cual es previamente realizada. El resultado de la actividad triptica es expresada como unidades caseinolíticas.

Otra proteína usada es la hemoglobina, la cual es des

naturalizada con urea, ajustándose el pH a 7.5 con NaOH, poniéndose a baño maría a 25°C por 45'. La hemoglobina desnaturalizada es puesta a reaccionar con la Tripsina por 10' a 25°C. Al finalizar la reacción enzimática, ésta es detenida con ácido tricloroacético 0.3N. La proteína no digerida es precipitada con el ácido, filtrándose y el filtrado obtenido se encuentra el producto de la reacción enzimática el cual es determinado a 280 nm. También el producto de la reacción es determinado colorimétricamente usando el reactivo fenolico de folin-cicoulateu el cual proporciona una reacción de color azul y por lo tanto ésta es determinada colorimétricamente. Esta determinación es realizada como sigue: a 5 ml. del filtrado obtenido de la reacción enzimática con la hemoglobina, es agregada 10 ml. de NaOH al 10% y al momento de efectuar la lectura es agregado el reactivo fenolico y en un lapso no mayor de 5' leer el colorimetro las densidades ópticas obtenidas, corriéndose con el blanco respectivo. Los resultados obtenidos son comparados contra un standard de tirosina (con una concentración de 8×10^{-4}) y posteriormente los resultados son expresados en Unidades Anson.

Sustratos Sintéticos:

En la utilización de sustratos sintéticos, sólo hay un enlace péptidico susceptible de atacar y por lo tanto, estos sustratos son más específicos. Los más usados son los esterres y amidas de los aminoácidos básicos. Estos sustratos presentan la

fórmula general de R-CO-X donde la especificidad de la enzima está determinada por el grupo acil y el tipo de unión susceptible de hidrólisis (amida, ester) la cual está definida por la naturaleza de X.

Los sustratos más recomendados de usar son los ésteres de los aminoácidos básicos, los cuales son más fáciles de cuantificar los productos de la reacción.

a) Actividad Esterasa

La actividad esterasa de la tripsina es determinada por métodos potenciométricos y espectrofotométricos.

Método de Potenciómetros: Estos están basados en la liberación de protones cuantificados por el cambio de pH que producen en la cubeta de reacción. Estas determinaciones son llevadas a cabo en un potenciómetro, que tiene adaptado un graficador. Usándose el método de Schwert, en un vaso provisto de agitador mecánico, se coloca una solución buffer pH 7.9 agregándose benzoil-L-arginina etil ester (BAEE) colocándose en un baño maría y controlándose la temperatura a 25°C. Por medio de una bureta se agrega hidróxido de sodio O.I.N. obteniéndose un pH de 8, posteriormente se agrega la solución de enzima decreciendo el pH de la solución y cuando llega a 7.9 se pone en marcha el cronómetro, como el pH de la solución sigue decreciendo se agrega hidróxido de sodio O.I.N. para ajustarlo constanteman

te el pH a 7.9. Después de 5 ó 6 determinaciones se grafican -- los mililitros de hidróxido de sodio gastados contra el tiempo, obteniéndose una línea recta en la cual la pendiente representa la actividad de la enzima.

Otros sustratos usados en las determinaciones potenciales son: p-toluensulfonil-L-arginina metil esteretil ester (TSAME) benzoil-arginina metil ester (BAME) y L-lisina-etil ester (LEE).

Métodos espectrofotométricos:

Estos métodos están basados en las diferencias de absorción de la enzima, sustrato y los productos de la hidrólisis enzimática, en la longitud de onda seleccionada.

Dentro de estos métodos tenemos los que se usan en el rango ultravioleta y el rango visible.

Los sustratos más ampliamente usados para estos métodos son: benzoil-L-arginina etil ester (BAEE) y p-toluensulfonil-L-argina metil ester (TAME), éste último presenta una gran selectividad para la tripsina (la Quimotripsina no hidrolisa al (TAME)).

Breve descripción del método de análisis.

Para el análisis se emplea solución buffer pH 8.1 el cual contiene CaCl_2 0.01 M, p-toluensulfonil-L-arginina metil ester (TAME) en una concentración final de 1.04×10^{-3} M. solu-

ción de Tripsina la cual contiene una concentración arriba de - 0.45 ug/ml.

Procedimiento: 3ml. de sustrato son colocados dentro de la celdilla del espectrofotómetro, dejar 3' para alcanzar la temperatura de reacción (30°C) balancear las absorbancias de -- las dos celdillas a 247 nm. añadir 0.1 ml. de agua a la celdi-- lla de referencia mezclándola bien. A tiempo cero agregar 0.1 - ml. de la solución de enzima a la celdilla de la muestra mez--- clándola bien. Tomar lecturas de las diferencias de absorbancia por un lapso de 5'. Obteniéndose el resultado en unidades TAME, la cual es definida como la cantidad de tripsina que cataliza - la hidrólisis de un micromole de TAME por minuto; así un mg. de tripsina es igual a 247 unidades TAME.

Los Nitrofenil esterés son otros de los sustratos usa dos en el análisis de la tripsina por métodos espectrofotométri cos de los más utilizados tenemos el p-nitrofenil N-benziloxi-- carbonil-L-lisinato clorhidrato, p-nitrofenil -p'-amidionbenzoa to clorhidrato, el resultado de la reacción enzimática es cuan tificado a 410 nm. El método seguido es: Buffer de Veronal de - sodio pH 8.3, p-nitrofenil-p' guanidinobenzoato (p-NPGB) disuel to en dimetil formamida a una concentración final de 0.01M Solu ción tripsina en una concentración final de $0.1 \text{ a } 0.7 \times 10^{-5} \text{ M}$, - espectrofotómetro con un adaptador para controlar la temperatu ra, el procedimiento es muy sencillo y es como sigue: la solu--

ción buffer con la enzima es colocada en las celdillas de reacción, ajustando la temperatura de reacción y a tiempo cero es agregado el sustrato; en la celdilla de referencia es colocada la solución buffer. Los cambios en la absorbancia son registrados por un lapso de 5' (41).

USOS TERAPEUTICOS DE LA TRIPSINA

Las preparaciones de tripsina son preferentemente usadas en forma tópica, la cavidad pleural, enfermedades del pulmón en las que es usada en forma de aerosol y en ciertos procesos inflamatorios en donde la enzima es inyectada intravenosamente o intramuscularmente.

La aplicación tópica de la tripsina incluye su uso en urología, otorrinolaringología y odontología. La tripsina causa una rápida curación de las heridas por digestión del tejido muerto a péptidos y aminoácidos privando así a las bacterias de su medio nutriente y al mismo tiempo de su habitat, favoreciendo la acción de las sulfonamidas y antibióticos administrados; además la tripsina destruye a la penicilina que es producida por algunas bacterias y así previene el efecto de ésta sobre la penicilina.

La forma de usar la enzima es en un gel amortiguante, como la metil celulosa usando una capa de 3 mm. sobre la herida y alrededor del área es cubierto con unguento de zinc para prevenir la irritación del tejido sano ya que la enzima causa irri

tación después de 24 hrs. el material necrosado es retirado con solución salina, repitiéndose varias veces el procedimiento.

Algunos investigadores usan la gaza humedecida en la solución amortiguante de tripsina mientras que otros la prefieren usar en forma de polvos.

Leonnecken usó la tripsina en 150 casos de necrosis - de varias etiologías tal como la úlcera del pulmón, úlcera decúbito que no fueron curadas por el tratamiento usual, siendo los resultados muy satisfactorios y además el tiempo de curación -- fue mucho más corto ya que sólo requirió de tres o ocho días, - con el procedimiento usual se tiene una duración de 21 días.

Frank (1) reportó una curación acelerada en los tratamientos de necrosis que tardaban en desaparecer de 40 a 60 días o más y con la tripsina tardaba de 7 a 21 días.

La aplicación local de tripsina es útil en quemaduras de tercer grado donde es muy importante limpiar la herida inmediatamente.

Trendtel y Leuterer recomendaron el uso de tripsina - en quemaduras de niños con el objeto de disminuir la absorción de productos tóxicos provenientes de las proteínas y para obtener una rápida curación cosmetológica.

Hasche, Kunde y Truss (1) reportaron un excelente uso de la tripsina en urología, usando solución de la enzima conteniendo penicilina G y sulfato de estreptomicina y dihidroestrep-tomicina, este preparado fresco es instilado dentro de la vía -

vaginal, permaneciendo por 30' este procedimiento es repetido - dos veces diariamente, obteniéndose buenos resultados en la cistitis fibrinos y cistitis radiológica. Las complicaciones vagi- nales que no fueron curadas con los tratamientos de sulfonami-- das, fueron sanadas o mejoradas usando el tratamiento de la en- zima. La ventaja de usar la tripsina para este tipo de padeci-- miento, es el hecho de que ésta licúa los deshechos celulares, elimina la pús y fibrina proporcionando una vagina más limpia - y así el médico observa la vagina mejor con el citoscopio.

En el terreno de la otorrinolaringología, Kukulies y Dziuba reportaron resultados satisfactorios de la tripsina en - el tratamiento de la sinusitis y empyema de las cavidades maxi- lares, usando una solución de tripsina con penicilina G y sulfa- to de estreptomocina en forma de gel y aplicándolo directamente en la cavidad, obteniéndose que, de 91 pacientes tratados 61 sa- naron y 24 requirieron un segundo tratamiento. En catarro cróni- co, la tripsina actúa dejando la mucosa nasal libre del mate-- rial adherente que es el causante del dolor; en los casos de ca- tarro purulento Kukulies espolvoreó en la nariz un polvo de --- tripsina-antibiótico removiéndose la secreción y permitiendo al fármaco actuar sobre la mucosa resultando de esto, una curación más rápida.

Hussareck encontró éxito en el tratamiento del hematoma del oído y su curación crónica de la glándula salival por --

inyección de tripsina dentro del conducto, observándose una curación rápida.

Auslander y Roth usaron la tripsina en odontología para tratar abscesos crónicos profundos usándola en casos de necrosis de la pulpa administrando una solución concentrada de la misma en el canal de la raíz y la limpieza es lograda por la eliminación de las células necróticas y desechos celulares. La tripsina no tiene efecto sobre las caries.

Uso de la Tripsina en Empyema Pleural y Hematorax

La introducción de tripsina constituye un gran avance en el tratamiento del empyema tubercular y no tubercular, disolviendo los coágulos de fibrina y pús y contribuye a la eliminación de las bacterias ya que, destruye el medio nutritivo de las mismas. En el procedimiento usual, es pinchado el empyema y enjuagado con solución salina e inyectando la solución de tripsina. Después de 8 días, la materia licuada es drenada y enjuagada repetidas veces. El procedimiento se repite hasta que el líquido drenado es completamente claro, es recomendable combinar la enzima con antibióticos excepto con aureomicina ó con agentes tuberculostáticos. Estas combinaciones son efectivas puesto que primero actúa la enzima y después el antibiótico. La tripsina no representa poder antigénico y por lo mismo se puede usar repetidas veces.

La tripsina se usa en forma de aerosol para las enfermedades del pulmón, causando una rápida licuefacción de las secreciones viscosas y eliminando éstas más fácilmente.

Farber y colaboradores administraron a pacientes con tuberculosis 100,000 a 150,000 unidades de tripsina por día observando diferentes cambios citológicos en el esputo en 12 de 16 casos.

TRATAMIENTO DE TRIPSINA EN AEROSOL DE ENFERMEDADES DEL PULMON

<u>Enfermedad</u>	<u>No. de casos</u>	<u>Dosis promedio de tripsina (U/días</u>	<u>Promedio tratamiento en días</u>	<u>Resultado Tratamiento</u>	<u>Favorable No. %</u>
Tuberculosis	45	250,000	14.30	Decrecimiento en cantidad y viscosidad del esputo menos <u>ba</u> ct <u>er</u> ias, incremento en capacidad vital. Pacientes <u>mejo</u> ran.	42 93
Bronquitis	23	250,000	4.10	Decrecimiento en cantidad y viscosidad del esputo, transformación de <u>-</u> purulento a <u>mu</u> cosa, incremento capacidad vital	23 100

TRATAMIENTO DE TRIPSINA EN AEROSOL DE ENFERMEDADES DEL PULMON

<u>Enfermedad</u>	<u>No. de casos</u>	<u>Dosis promedio de tripsina (U/día)</u>	<u>Promedio tratamiento en días</u>	<u>Resultado Tratamiento</u>	<u>Favorable No. %</u>
Neumonía sin solución	6	250,000	5.9	Resolución de la neumonía, incremento en el esputo y - disminución de la temperatura a la normal.	6 100
Abcesos del pulmón	3	375,000	12.21	Sanó la cavidad	3 100
Asma bronquial	31	125,000	.7	Incremento en la capacidad vital, disminución de la viscosidad del esputo.	27 87

TRATAMIENTO DE TRIPSINA EN AEROSOL DE ENFERMEDADES DEL PULMÓN

<u>Enfermedad</u>	<u>No. de casos</u>	<u>Dosis promedio de tripsina (U/día)</u>	<u>Promedio tratamiento en días</u>	<u>Resultado tratamiento</u>	<u>Favorable No. %</u>
Fibrosis cística del pancreas	6	125,000 250,000	2.7	Disminución en la cantidad y visco- sidad del esputo, transformación del esputo purulento a mucosa.	

Uso Intramuscular e intravenoso de Tripsina: Innerfiel y sus colaboradores observaron en 1952 que la tripsina inyectada intravenosamente en animales, causaba fibrinolisis y sobre esta observación la usaron en el tratamiento de tromboflebitis administrándola parenteralmente, observando que la enzima tenía un marcado efecto antiflogístico, abatiéndose la inflamación en los primeros 2 a 3 días, sin embargo la fibrinólisis no comienza sino hasta varios días después. Investigaciones adicionales revelan que la tripsina tiene un efecto favorable no solamente en la tromboflebitis sino también en otros tipos de inflamación no importando si son de origen bacteriano viral, químico o alérgico.

El mecanismo de acción antiflogístico no es bien conocido existiendo varias teorías no muy satisfactorias, una de ellas menciona que la enzima rompe la pared que el organismo ha construido alrededor del foco de la inflamación formando una red de fibrina que la tripsina degrada y así los agentes terapéuticos tienen acceso al foco de infección.

Innerfield y sus col. inyectan tripsina intravenos con dosis de 10 a 15 mg. y a la cual se le ha agregado un antihistamínico usándolo en los casos de tromboflebitis crónica o aguda obteniéndose resultados favorables en el 90% de los casos.

Hogen (1) ha realizado trabajos sobre la aplicación de la tripsina en oftalmología administrándola intramuscularmente, usándola en casos de trombosis de la vena central de la retina y

y 10 al 12 pacientes mejoran con este tratamiento ya que el campo de visión se amplía y el edema y la exudación disminuyen.

En México se realizaron estudios de las infecciones -pélvico genitales, usando un tratamiento en base a la asociación Tripsina-Antibiótico (13) permitiendo actuar satisfactoriamente sobre los microorganismos y la inflamación. Este estudio fue efectuado con paciente con infecciones pélvico-genitales administrando cada 6 horas cápsulas que contienen lo siguiente:

Clorhidrato de Tetraciclina	125 mg.
AC. Cítrico.....	60 mg.
Tripsina.....	20.2 mg.
Quimotripsina.....	6.45 mg.
Ribonucleada.....	0.5 mg.

La asociación de las tres enzimas contribuyen a reforzar la acción antiflogística y favoreciendo la fagocitosis, la inclusión del ácido Cítrico según Welch y Col. es para favorecer la absorción intestinal del antibiótico hasta en un 100%, - permitiendo altas concentraciones sanguíneas del mismo, con lo cual disminuye la posibilidad de creación de resistencia del antibiótico por parte del microorganismo causante.

La alta incidencia de éxitos obtenidos permite concluir que es efectiva la sinergia de los fármacos usados, recomendamos por lo tanto en los tratamientos de las infecciones g

necológicas.

La tripsina se usa con éxito en los procesos Bronconeumónicos del infante (36). El estudio fue realizado usando la mitad de los pacientes con el tratamiento conteniendo la Tripsina y la otra mitad fue usada como Control. A los del primer grupo se les administró Tripsina en presentación pediátrica c/12 hrs. En ambos casos los pacientes fueron tratados con el tratamiento habitual para bronconeumonía, consistente en la aplicación de - penicilina Sódica, ambiente húmedo, control de la temperatura - medios físicos. Observándose una diferencia con los grupos siendo la evolución de la enfermedad más corta y mejor en el grupo tratado con la tripsina siendo su acción más o menos como sigue: cuando el agente causal de la bronconeumonía (microorganismos, agentes tóxicos) llega al alveolo, produce una inflamación con el consecuente exudado, invalidéz del área inflamada y congestión sanguínea, la tripsina inhibe la formación de fibrina permitiendo la salida del exudado líquido y celular al interior -- del vaso.

La duración de la enfermedad se acorta en un 30% de los casos en el grupo tratado con la tripsina, concluyéndose -- que la tripsina es útil como coadyuvante en el tratamiento de los procesos bronconeumónicos.

LIOFILIZACION DE TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA

La liofilización es un proceso mediante el cual las enzimas son estables por un tiempo mas prolongado, puesto que la humedad es un factor que afecta a la estabilidad de las enzimas.

Las muestras a ser liofilizadas deben ser acuosas, ya que la presencia de solventes orgánicos es altamente indeseable, bajando el punto de congelación del agua e incrementando la temperatura de fusión de la muestra durante la liofilización, como consecuencia de esto último hay formación de abundante espuma, ocasionando una desnaturalización de las proteínas. Cuando se desean liofilizar soluciones de enzimas con buffer, se deben tomar precauciones como son; el tipo de buffer así como el pH del mismo.

Una gran variedad de recipientes son adecuados para realizar la liofilización. Estos deben resistir la presión y estar hechos de materiales que permitan la razonable transferencia de calor de afuera hacia adentro. El tamaño de los envases debe ser adecuado para que la solución a liofilizar ocupe un volumen no mayor del 20 % útil.

Para las soluciones diluidas, hay precauciones que deben ser tomadas en cuenta, puesto que estas dejan un residuo ligero y parte de éste es arrastrado al condensador, ocasionando

perdidas. Esto es evitado con protecciones en las charolas tales como; tamiz de alambre, lana de vidrio. Estas barreras atrapa el material arrastrado.

El proceso de liofilización, es realizado a material a granel y a producto terminado. El material a ser procesado es colocado en los recipientes respectivos, siendo congelado a -50°C , permaneciendo entre 8 - 12 horas. Finalizado el tiempo, comienza el secado, el cual es iniciado en dos fases, la primera en la cual se pone una temperatura de 20°C , llamado calor bajo; ésta es la fase crítica de la liofilización. La segunda fase es la etapa propiamente de secado, conociendosele como fase de calor alto, la temperatura es de 40°C . El producto está listo cuando alcanza una temperatura constante durante ocho horas.

FORMAS FARMACEUTICAS:

En la Industria Farmacéutica existen diferentes formas farmacéuticas conteniendo la Quimotripsina y Tripsina las cuales son clasificadas para uso oral y las destinadas para uso inyectable.

Dentro de las de Uso Oral, se encuentran las cápsulas, tabletas y grageas de capa entérica. Las cápsulas son las más -- frecuentemente usadas, esta forma la enzima se encuentra en forma de gránulos o nucleos, los cuales son previamente mezclados -- con otras enzimas y granulados para posteriormente mezclarse con los otros componentes de la fórmula que están en forma de polvos, éstos generalmente son algunos antibióticos como la ampicilina -- o clorhidrato de tetraciclina o clorafenicol ó algún espectorante o antihistamínico. Las tabletas se encuentran en pequeña cantidad en el mercado ya que es más difícil la obtención de esta -- forma puesto que se aplica una compresión, la cual es una fuerza física que altera la enzima.

Las grageas, es una forma farmacéutica poco común por la formación de la tableta.

La forma destinada de uso inyectable se encuentra la -- presentación en liofilizado. En solución no es posible puesto -- que no es estable. El liofilizado es muy fácil de preparar, si se requiere de una solución acuosa de la Quimotripsina o tripsina con las demás enzimas ajustándose el pH de la máxima estabilidad.

dad en solución y filtrándolo por membrana de la porosidad adecuada para eliminar a todas las bacterias y posteriormente llenarla en condiciones estériles en frasco ampula o ampolleta colocándola en charola del liofilizador y posteriormente congelarlas para después secarlas, al final de la liofilización se obtiene un polvo muy fino que fácilmente puede ser perdido en el proceso de secado, esto es prevenido por la adición de manitol o glicina que proporciona cuerpo al liofilizado.

Estos liofilizados son acompañados de su solvente los cuales están formados por agua a la que se le puede adicionar un antihistamínico o algún expectorante, así como un anestésico para prevenir el dolor al ser administrados.

En algunas ocasiones la enzima se encuentra en la forma liofilizada y el antibiótico en polvo y ya para su administración se mezclan los tres componentes, es decir, el liofilizado, el antibiótico y el solvente obteniéndose un efecto más rápido.

EFFECTOS COLATERALES

La Quimotripsina y Tripsina no presentan efectos colaterales, solamente pequeños malestares dependiendo de la forma farmacéutica administrada.

Ejemplo: en la administración parenteral por vía intravenosa produce una sensación de caliente que puede llegar hasta un shock, por lo tanto esta debe administrarse bajo vigi-

lancia médica, la administración por vía intramuscular proporciona una sensación de ardor en el sitio de la inyección la cual es prevenida por la administración de un anestésico.

La administración oral provoca en algunos casos intolerancia gástrica, vómito y diarrea.

CONTRAINDICACIONES:

La administración de Quimotripsina y Tripsina está contraindicada en: Pancreatitis aguda, enfermedades hemorragíparas, degeneración amarilla del hígado, albuminuria, hematuria e hipersensibilidad a los componentes de la fórmula.

Cuando la enzima es administrada en combinación con un antibiótico está contraindicada cuando se presenta alergia al antibiótico.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

A través del presente trabajo, se determinarán algunos puntos de interés para la obtención de la tripsina y quimotripsina, como son:

1.- Es preferible trabajar con páncreas bovino, porcino que con los otros mencionados en el presente trabajo.

2.- El tiempo y temperatura de descongelamiento de las vísceras deben ser controladas, las cuales dependerán de los resultados prácticos obtenidos durante las investigaciones.

3.- En el proceso de extracción, deben controlarse rigurosamente las temperaturas y pH, para la obtención de mejores resultados.

4.- Durante la purificación con sulfato de amonio, es preferible trabajar con la sal en forma sólida, evitando los grandes volúmenes. Es importante controlar el pH durante la adición de la sal, puesto que el pH se eleva, ocasionando desnaturalización de las proteínas.

5.- Durante la activación de los dos zimógenos, es importante efectuar determinaciones de la actividad enzimática con los sustratos específicos.

6.- Durante los procesos de purificación, es recomendable efectuar electroforesis.

Por todo lo anteriormente expuesto, concluimos la fac-

tibilidad para la obtención de la tripsina y quimotripsina en forma purificada, a partir de páncreas fresco o congelado

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abderhalden Rudolph. Clinical Enzymology
Van Nostrand Company, Canada 1961.
- 2.- Beardslee Ronald and Zahnley James
Archives of Biochemistry and Biophysics 158, 806-811
(1973).
- 3.- Brown K.D. and Shupe R.E. and Laskowski M.
Journal Biological Chemistry 1973, 99 (1948)
- 4.- Cole David and Kinkade J.M.
Journal of Biological Chemistry 236, 9, 2443-2445
(1961)
- 5.- Coletti-Previero M-A, and Axelrud-Cavadore C., and
Previero A, Biochemical and Biophysical Research
Communications.
- 6.- Colowick P. Sydney and Kaplan O. Nathan
Methods in Enzymology Vol. II New York (1955)
- 7.- Coats Eugene
Journal of Pharmaceutical Sciences 59-6, 731-746 (1970)
- 8.- Earl W. Davie and Naturath Hans
Journal Biological Chemistry 212, 515-529 (1955)
- 9.- Erlanger Bernad, Kikowsky Nicholas, Cohen William
Archives of Biochemistry and Biophysics 95, 271-278
(1961)
- 10.- Farmer A. David and Hageman H. James
The Journal of Biological Chemistry Vol. 250 No. 18
7366-7341 (1975)

- 11.- Pastoz and Fersht Alan R.
Biochemistry Vol. 12 No. 11 2025-2034 (1973)
- 12.- Gertrude E. Perlmann and Lazlo Lorand
Methods in Enzymology Vol. XIX (1970)
- 13.- Gordillo Fernández José y Hernández Samuel
Revista Mexicana de Medicina 45, 490, 1965
- 14.- Gurcharan S. Jodhka
Journal of Pharmaceutical Sciences 64, II, 1858 (1975)
- 15.- Jakoby B. William
Methods in Enzymology Vo. XXII.
- 16.- Jany K. D. Keil W, Meyer H. and Kitz H.
Biochimica et Biophysica acta 453, 62-66 (1976)
- 17.- Kreke W. Cornelius
Journal Pharmaceutical Sciences 58, 4 (1969)
- 18.- Kent Stewart
Analytical Biochemistry 51, II-18 (1973)
- 19.- Kunitz Moses and Northrop John
Journal Gen Phusiology 19, 991, 1936
- 20.- Kunitz M.
Journal Gen Physiology 2, 207, (1938)
- 21.- Kunitz M.
Journal Gen Phisiology 21, 601, (1938)
- 22.- Journal Gen Phisiology 32, 263 (1948)

- 23.- Kunitz Moses
Journal Gen Physiology 33, 349 (1950)
- 24.- Kunitz Moses
Journal Gen Physiology 35, 423, (1952).
- 25.- Laskowski M.
Journal Biological Chemistry 166, 555, (1946)
- 26.- Liener Irvin
Archives of Biochemistry and Biophysics 88, 216-221
(1960)
- 27.- Maroux S. And Desnuelle P.
Biochimica Biophysics acta 181, 59, 72, (1969)
- 28.- MC. Donald Margret and Kunitz Moses
Journal General Physiology 29, 155, (1946)
- 29.- Martin
Remington Pharmaceutical Sciences
Thirteen Edition
- 30.- Laguna José
Bioquímica
- 31.- Northrop John Kunitz Moses
Jornal General Physiology 16, 267, (1932)
- 32.- Northrop John and Kinitz Moses
Science 80, 505 (1934)
- 33.- Northrop John and Kunitz Moses
Cristalline Enzymes "2nd. Edition Columbia University
Press New York, 1948.

- 34.- Fechere Francois and Neurath Hans
Journal Biological Chemistry 229, 389 (1957)
- 35.- Ramirez Ajax.
Revista Mexicana de Medicina 990, XLVI, 285 (1956).
- 36.- Rovey M. and Desnuelle P.
Biochimica Biophysica Acta 124, 402 (1966).
- 37.- Schorcoeder and Shaw Elliot
Journal of Biological Chemistry 243, II, 2943, 2949
(1968)
- 38.- Schwet G.W. and Kaufman S.
Journal Biological Chemistry 180, 517, (1949)
- 39.- Minerva Urológica 24, 6, 296-301 (1972)
- 40.- Fauber Henry
The Chemistry and Technology of Enzymes
- 41.- Walker John and Keil Borivoj
European Journal Biochemistry 32, 486-491 (1973)
- 42.- Wright H.T., Kraut J. and Wilcox P.
Journal Molecular Biological 37, 363 (1968)
- 43.- Mathews, Cohen G.H.
Journal Molecular Biological 36, 179, (1968)
- 44.- Zemmerman M. Yurewicz Edward
Analytical Biochemistry 70, 258-262 (1976)
- 45.- Zemmerman M. Aske B., Yurewics Edward, Patel G.
Analytical Biochemistry 78, 47-51 (1977).