

# Ensayo de un Método para la Determinación Cuantitativa del Poder Proteolítico y Amilolítico de las Sustancias Medicamentosas que contienen Enzimas Proteolíticas o Amilolíticas

**JUAN CARLOS CHIARINO — HILDA MONFORT DE OLASCUAGA**

LABORATORIO CENTRAL DE QUIMICA DEL MINISTERIO DE  
SALUD PUBLICA

Hasta ahora no han existido normas que permitieran valorar en forma cuantitativa la actividad proteolítica y amilolítica de las sustancias medicamentosas en formas especializadas. Sólo se conocen los métodos de contralor de las actividades indicadas por el Codex francés y otras farmacopeas para la Pepsina, Diastasa, Pancreatina y Papaína.

Estos métodos no son aplicables a las especialidades farmacéuticas, que además de esos productos enzimáticos contienen otras sustancias medicamentosas, y que se presentan en forma de comprimidos, elixires, extractos u otras variedades.

Creemos que es necesario que exista un método cuantitativo que permita determinar esa actividad en forma específica, apreciándose valores comparativos entre los distintos preparados, al mismo tiempo que se pueda, por otra parte, apreciar el grado de estabilidad, frente a la acción del tiempo, de una preparación farmacéutica de ese tipo, teniendo presente las determinaciones aludidas.

Para ello, hemos instituído la unidad amilolítica y la unidad proteolítica en forma convencional, como en seguida se expondrá.

Como unidad amilolítica (U.A.), designamos la menor cantidad de un producto enzimático amilolítico, capaz de transformar totalmente 1 c.c. de un engrudo de almidón, al 0,5 %, después de haberse mantenido a 37° C., durante 24 horas en una estufa.

Como unidad proteolítica (U.P.), designamos la menor cantidad de un producto enzimático proteolítico, capaz de transformar total-

mente 1 c.c. de una solución acuosa de suero normal de caballo, estéril, al 5 %, en agua destilada y después de haberse mantenido también a la estufa a 37° C., durante 24 horas.

Para efectuar ambas operaciones y determinar el número de unidades, las cuales deben referirse a nuestro juicio, en el caso de comprimidos por unidad de éstos, y en caso de líquidos o elixires, por centímetro cúbico o por gramo.

Veamos unos ejemplos:

*Primer caso: Poder amilolítico.* — Determinación de unidades (ejemplo: comprimidos):

Se toma un comprimido, se deslíe en agua; se filtra si es preciso, y después de sucesivos ensayos en varias diluciones (1/10, 1/100, 1/1000, etc.), en los cuales podrá aparecer al principio una actividad amilolítica total sobre toda la escala, en la forma que más abajo se detalla; se encontrará que una solución de un comprimido en 5000 c.c. de agua, por ejemplo, estará en condiciones de poder hacer la valoración de referencia.

Dicha operación se efectúa en la forma siguiente:

Se hace una dilución de almidón soluble (reactivo) al 0,5 % (ex-tempore) bien homogéneizada.

Se toman 10 tubos de ensayo colocados en hilera en una gradilla de madera, y se agrega a cada tubo 1 c.c. de esta dilución de almidón.

Se agrega sobre éste, colocado en los referidos tubos, sucesivamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 c.c. de la solución problema, llevándolos todos a 10 c.c. de volumen, y se numeran del 1 al 10.

Se agita para homogeneizar bien. Se lleva el soporte a la estufa a 37° C. durante 24 horas.

Al cabo de este tiempo, se agrega a cada tubo 11 gotas de una solución diluída de agua yodada y se agita nuevamente.

En este caso, aparecerá una parte de la escala coloreada de color violeta pardusco, indicando que aún hay parte de almidón, empezando desde el tubo N.º 1, o sea la que tenía menor cantidad de enzima, desapareciendo el color en el tubo N.º 4, vale decir, que a partir del tubo 4.º hasta el 10.º, la enzima hidroliza por completo al polisacárido, transformándolo en glucosa.

La cantidad mínima de enzima, pues, estaba contenida en 4 c.c. de una dilución hecha con un comprimido en 5000 c.c. de agua destilada.

*Cálculo a efectuarse para la determinación de unidades*

$$\left. \begin{array}{l} 4 \text{ c.c.} = 1 \text{ unidad} \\ 5000 \text{ c.c.} = X \end{array} \right\} X = \frac{5000}{4} = 1,250$$

Cada comprimido posee pues, 1,250 unidades amilolíticas (U.A.).

*Segundo caso: Poder proteolítico.* — Determinación de unidades proteolíticas.

Procediendo en la forma que se indica y similar a la anterior, se constató que en la dilución de 1 en 1000, se observa que una parte de la escala presenta una acción proteolítica.

He aquí un ejemplo: se hace una dilución de suero normal de caballo, estéril, al 5 % en agua destilada.

Se toman 10 tubos de ensayo y se colocan en una gradilla de metal; se agrega a cada tubo 1 c.c. de la expresada solución, y se numeran del 1 al 10.

A cada uno de estos tubos se agrega 1 c.c., 2 c.c., 3 c.c. hasta 10 c.c., sucesivamente, de la solución problema, se llevan todos los tubos al mismo volumen de 10 c.c., se agita bien, a fin de homogeneizar y se lleva a la estufa a 37° C. durante 24 horas.

Efectuado lo cual, se agrega a cada tubo IV gotas de lejía de soda al 40 %, se homogeneiza, se lleva a baño maría hirviente 5 minutos, y se adicionan II gotas de una solución de sulfato de cobre al 5 %; se lleva otra vez al baño maría, otros 5 minutos, y se observará la escala.

Mientras que algunos tubos presentan un contenido de color violado rojizo, empezando desde el número 1, hasta llegar al 4.º inclusive, a partir de éstos, no habrán modificado su color.

Indica esto, que en los 4 primeros queda aún parte de las proteínas del suero, mientras que en los restantes la acción proteolítica es TOTAL.

Vale decir pues, que el tubo N.º 4, o sea donde existe 4 c.c. de la solución efectuada con un comprimido diluido en 1000 c.c., es donde se encuentra la menor cantidad de fermento proteolítico, luego de acuerdo con el cálculo ya expuesto, el número de unidades será el siguiente:

$$\frac{1000}{4} = 250 \text{ U.P.}$$

Este método nos ha permitido determinar el valor comparativo de varios productos de este tipo, en una forma específica, y que consideramos perfectamente clara, y capaz de poder ser apreciada, sin necesidad de recurrir a métodos confusos y difíciles de interpretar, por lo cual consideramos que es factible de prestar alguna utilidad en la declaración de las fórmulas de las especialidades farmacéuticas, en sus rótulos o etiquetas, en su relación con el grado de actividad fermentativa frente a los prótidos y a los glúcidos, así como también para poder apreciar el grado de conservación de la actividad de estos preparados, cuya alteración por la acción del tiempo no es posible determinar, sino por este método.

(Trabajo presentado al Primer Congreso Panamericano de Farmacia realizado en La Habana.)