PAPAÍNA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
96
97
98
99
100
101
102

9001-73-4

Definición - Papaína es una sustancia proteolítica purificada obtenida del látex del fruto de *Carica papaya* L. (Fam. Caricaceae). La Papaína preparada según se indica en *Valoración*, contiene no menos de 6.000 Unidades por mg. La Papaína con una mayor potencia digestiva puede reducirse a una potencia similar a la de la Sustancia de Referencia mezclándola con papaína de actividad menor, lactosa u otros diluyentes adecuados. Una Unidad de Actividad de Papaína es la que libera el equivalente a 1 µg de tirosina de un sustrato de caseína especificado en las condiciones establecidas en *Valoración*, empleando una concentración de enzima que libera 40 µg de tirosina por mL de *Solución muestra*.

Sustancia de referencia - Papaína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos impermeables, en un sitio fresco.

ENSAYOS

Determinación del pH <250> - Entre 4,8 y 6,2, determinado sobre una solución 1 en 50.

Pérdida por secado <680> - Secar al vacío a 60 °C durante 4 horas: no debe perder más de 7,0 %.

VALORACIÓN

Actividad de proteasa (Poder de digestión de caseína)

Solución de fosfato dibásico de sodio - Disolver 7,1 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en agua para obtener 1 litro de solución. Agregar 1 gota de tolueno como conservante.

Solución de ácido cítrico - Disolver 10,5 g de ácido cítrico monohidrato en agua para obtener 1 litro de solución. Agregar 1 gota de tolueno como conservante.

Sustrato de caseína - Dispersar 1 g de caseína tipo Hammersten en 50 mL de *Solución de fosfato dibásico de sodio*. Colocar en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos, mezclando ocasionalmente. Enfriar a temperatura ambiente y agregar *Solución de ácido cítrico* para ajustar a pH 6,0 ± 0,1. Mezclar la solución de forma rápida y

continúa durante la adición de *Solución de ácido cítrico* para evitar que la caseína se precipite. Diluir a 100 mL con agua. [NOTA: preparar en el día de su uso.]

Solución reguladora - Disolver 3,55 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en 400 mL de agua en un matraz aforado de 500 mL. Agregar 7,0 g de edetato disódico y 3,05 g de clorhidrato de cisteína monohidrato. Ajustar con ácido clorhídrico 1 M o hidróxido de sodio 1 M a pH 6,0 ± 0,1, diluir a volumen con agua y mezclar. [NOTA: preparar en el día de su uso.]

Solución de ácido tricloroacético - Preparar una solución que contenga 300 mg de ácido tricloroacético por mL. [NOTA: esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente]

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 100 mg de Papaína SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 mL y agregar *Solución reguladora* para disolver. Diluir a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un matraz aforado de 50 mL, diluir con *Solución reguladora* a volumen y mezclar. Emplear dentro de los 30 minutos de su preparación.

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad de Papaína equivalente a aproximadamente 100 mg de Papaína SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 mL y agregar *Solución reguladora* para disolver. Diluir a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un matraz aforado de 50 mL, diluir con *Solución reguladora* a volumen y mezclar. Emplear dentro de los 30 minutos de su preparación.

Procedimiento - Preparar 12 tubos de ensayo con tapón como se indica en la *Tabla*. Posteriormente, filtrar el contenido de cada tubo a través de un papel de filtro de porosidad media, desechando los primeros 3 mL del filtrado (los filtrados deben ser transparentes). Leer las absorbancias de los filtrados de todas las soluciones contra sus blancos respectivos a 280 nm. Graficar lecturas de las absorbancias de E_1 , E_2 y E_3 en función de la concentración de enzima de cada nivel correspondiente. Empleando la curva obtenida y teniendo en cuenta los factores de dilución, calcular la potencia en Unidades por mg de la Papaína en ensayo.

103
104
105

Tabla

	Tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	E_1	E_1	E_2	E_2	E_3	E_3	M_2	M_2	Blanco E_1	Blanco E_2	Blanco E_3	Blanco M_2	
Sustrato de caseína (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
	Colocar en un baño de agua a 40 °C durante 10 minutos												
Preparación estándar (mL)	1,0	1,0	1,5	1,5	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-	
Preparación muestra (mL)	-	-	-	-	-	-	1,5	1,5	-	-	-	-	
Solución reguladora (mL)	1,0	1,0	0,5	0,5	-	-	0,5	0,5	-	-	-	-	
	Mezclar agitando por rotación suave y devolver al baño de agua. Para cada tubo, cronometrar 60 minutos desde la adición de la última solución.									-	-	-	-
Solución de tricloroacético (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
	Agitar vigorosamente luego del agregado a cada tubo.												
Preparación estándar (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,5	2,0	-	
Preparación muestra (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	
Solución reguladora (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,5	-	0,5	
	Colocar en un baño de agua a 40 °C durante 30 a 40 minutos (para permitir que la proteína precipitada se coagule por completo)												

106