

Método de preparación de Insulina y derivados

Por J. R. MENDIVE

La insulina comenzó a prepararse en el Instituto Bacteriológico en el año 1923. Desde entonces hasta la fecha el método se ha ido modificando a medida que los progresos de la técnica y las instalaciones lo permitían, habiéndose llegado a un rendimiento y pureza, en la obtención de esa hormona, de relativa constancia, lo que nos induce a publicar detalladamente cómo se procede en la actualidad para la obtención de la misma en estado amorfo, cristalino y en forma de compuestos insolubles.

En la solución de los diversos problemas que se presentaron, intervinieron en primer lugar el Director del Instituto Bacteriológico, Dr. A. SORDELLI, quien inició su elaboración y planeó las actuales instalaciones, y las demás personas a cuyo cargo estuvo la misma en las diversas épocas: los Dres. WERNICKE, PACELLA, SCOTTI, SAVINO, MODERN, LARA, DEULOFEU y MENDIVE. En los últimos años el dosaje de la actividad ha estado a cargo del Dr. A. TORINO y de la Srta. D. PEDROSA sin cuyo concurso no se hubiera podido llegar a estudiar el método de producción en toda su extensión.

Método para 60 Kg. de páncreas. — Los páncreas * una vez extraídos de los animales, se limpian bien, librándolos del exceso de tejidos grasos y conectivos y se los coloca en un recipiente con hielo picado; en esta forma las glándulas son enfriadas y mantenidas a una temperatura baja desde el momento de la extracción hasta el de su elaboración (nota 1).

Las glándulas se muelen en una máquina picadora utilizando el tamiz N° 42 de 4,5 mm de diámetro. Se colocan las glándulas así desmenuzadas en 90 l. (1,5 litros por Kg) de alcohol de 80° al que se le ha agregado 2,400 cm³ (40 cm³ por Kg) de ácido clorhídrico concentrado (D = 1,19). Esta mezcla alcohol-ácido se ha enfriado previamente a 4-5°C (nota 2).

La mezcla se agita continuamente durante 7 horas y luego intermitentemente durante la noche. La temperatura se mantiene a 4-5°C durante la extracción. La duración de la misma es de 20-21 horas al cabo de las cuales se centrifuga en centrifuga de canasta utilizando una tela de trama poco espesa.

El líquido obtenido es algo turbio y tiene un pH 1,6-2. El residuo es re-extraído durante 2 horas a temperatura ambiente con 48 l. (800 cm³ por Kg) de alcohol de 50°. Se centrifuga nuevamente y el líquido obtenido, cuyo pH es 1,8-2,2, se une al primero. El residuo se elimina.

Los líquidos reunidos se llevan a pH 8 (indicador rojo de fenol) con una solución concentrada de amoníaco, y se filtra añadiendo 3 Kg de supercel en una batería de 14 filtros como los descritos por SORDELLI¹ (nota 3).

Se obtiene un líquido límpido de color amarillento que después de acidificado con ácido sulfúrico al 15 % hasta tener un pH 2-2,2 (azul de timol como indicador), se concentra en vacío, cuidando que la temperatura no pase los 25°C, hasta obtener un volumen igual a 1/8-1/10 del original. En esta forma se elimina todo el alcohol y parte del agua. A la solución acuosa, turbia, resultante, que debe estar a pH 2-2,2 (corregirla por adición de ácido si así no

* Los páncreas usados son de bovinos faenados en el Matadero y Frigorífico Municipal de la ciudad de Buenos Aires.

¹ A. SORDELLI. « Folia Biológica », N° 61-65, pág. 273 (1936).

fuera) se le añade sulfato de amonio cristalizado exento de hierro (400 g por cada litro de solución), se calienta rápidamente en baño de vapor agitando continuamente hasta llegar a 50°, operación en la que no debe tardarse más de 10-15 minutos. El sulfato de amonio se disuelve completamente. Se deja enfriar y el precipitado se reúne en la superficie del líquido formando una masa amarillenta y compacta (torta o sombrero) que contiene la insulina junto con otras proteínas y grasas. Se deja una noche a 4°C., se sifona el líquido inferior, amarillento y límpido, y el precipitado se coloca entre papeles de filtro para que escurra bien todo el líquido obteniéndose una masa bien seca, lo que se logra dejándola 24 horas en esa forma (nota 4). Una vez obtenido esto se suspende en 2,400 l. (40 cm³ por Kg) de alcohol a 80° acidificado con 2 ‰ de ácido clorhídrico concentrado (D: 1,19). La suspensión se deja en cámara fría a 4°C durante 4-5 horas (nota 4), al cabo de las cuales se centrifuga. El residuo insoluble se suspende nuevamente en 1.200 cm³ (20 cm³ por Kg) del mismo alcohol y después de media hora se centrifuga. El residuo se elimina y los líquidos de extracción se miden. Generalmente se obtiene un volumen igual al del alcohol utilizado (a veces algo menos). Se coloca en un recipiente apropiado y se añaden 10 volúmenes de alcohol de 95° agitando continuamente. Precipita en esta forma la insulina y otras proteínas. Se deja sedimentar durante una noche y el líquido alcohólico sobrenadante, amarillento y límpido, se elimina por succión. El precipitado proteico se filtra por Büchner, se lava con alcohol de 95° primero y luego con éter hasta eliminar el alcohol.

Este precipitado se guarda bajo éter juntándolo con el de otras partidas hasta iniciar la purificación. Para esto se filtra por Büchner y se elimina el éter restante colocándolo en una bandeja donde se extiende para facilitar la evaporación del mismo.

Se obtiene así un polvo blanco liviano (insulina bruta) en una proporción de 1,2-1,7 g por Kg de páncreas. Esta eliminación del éter al aire es conveniente sustituirla por vacío sobre todo en días húmedos, pues la humedad que se condensa comienza a disolverlo.

A continuación se detallan las operaciones de purificación de la insulina bruta proveniente de 500 Kg de páncreas:

El polvo seco se coloca en un mortero y se le añade de 0,5 a 1 litro de agua en pequeñas porciones agitando continuamente hasta formar una pasta primero y luego una suspensión fina. Se acidifica entonces con ácido clorhídrico al 10 % hasta un pH 2-2,2. Se pasa la solución a un vaso de vidrio y el mortero se lava con agua acidulada. A los líquidos reunidos se los lleva a un volumen de 3 l, cuidando que la reacción está a pH 2-2,2. Se deja en reposo 24 horas durante las cuales sedimentan algunas sustancias insolubles y el líquido oscuro sobrenadante se pasa a otro vaso. El sedimento (a veces escaso) es extraído nuevamente con 300 a 500 cm³ de agua a pH 2 y al cabo de 2 horas centrifugado. El líquido sobrenadante menos oscuro que el de la primera extracción se une a él (nota 5).

Se tiene así un volumen de alrededor de 3,5 litros.

Esta solución se lleva a pH 4,7-4,9 por adición de hidrato de sodio al 10 % con agitación continuada. El líquido adquiere una turbidez pronunciada que en general no llega a separarse en forma de precipitado. Se le agrega entonces 10 % de cloruro de sodio (10 g por cada 100 cm³ de solución) separándose un precipitado abundante. Se deja en reposo a temperatura ambiente durante 48 horas (nota 6).

Se decanta el líquido oscuro y se elimina. Al precipitado se lo suspende en un litro de agua y se acidula hasta pH 2-2,2 disolviéndose rápidamente. La solución oscura se diluye con agua cuidando que la reacción esté a pH 2-2,2, hasta tener un volumen de 2-2,5 litros.

Se agrega hidrato de sodio al 10 % agitando continuamente hasta que la solución llegue a pH 4,7-5 (nota 7). Se separa un precipitado blanco, que se deposita fácilmente. Se deja reposar 24-48 horas en cámara a 4°C, al cabo de las cuales el líquido sobrenadante se elimina por succión, el precipitado se centrifuga para librarlo del exceso de líquido que lo impregna y se lo suspende en 1-1,5 litros de agua disolviéndolo por añadido de ácido clorhídrico al 10 % hasta pH 2-2,2.

Una vez disuelto todo, se añade hidrato de sodio al 10 %, hasta pH 4,7-5 (nota 7), en que se separa un precipitado más blanco aún que el de la operación anterior. Se deja 24-48 horas en cámara fría a 4°C.

Se elimina por succión el líquido sobrenadante, el precipitado se centrifuga como la vez anterior. Se lo suspende luego en 1-1,5 litros de agua y se acidula con ácido clorhídrico al 10 % hasta pH 2,2 en que se disuelve completamente. Se obtiene así una insulina que tiene una pureza de 12 a 14 U. I. por mg con un rendimiento de alrededor de 2000 U. I. por Kg de páncreas. Una mayor purificación se logra por precipitación con ácido clorhídrico (trabajo 7).

Una vez obtenida la solución proteica que contiene la insulina se determina la potencia de esta solución utilizando el método de convulsiones en ratones blancos para determinaciones aproximadas y el de descenso de la glucemia en conejos para determinaciones más exactas, cuyos detalles se pueden ver en el trabajo 6. Cuando ésta ha sido establecida se diluye con agua destilada hasta tener la concentración deseada (20 ó 40 U. I. por cm³) añadiendo como conservador 1 ‰ de tricresol. Se ajusta la reacción a pH 2,8 y se filtra estérilmente a través de bujía BERKEPELD. En esta forma queda el producto pronto para su envase y distribución.

Cristalización de la insulina

El método utilizado para la cristalización de la insulina es en líneas generales el descrito por SCOTT¹.

Hemos comprobado que cuanto mayor es la pureza de la insulina de que se parte mayor es la pureza y rendimiento en insulina cristalizada.

Una solución de insulina que contiene 120.000 U. I. (pureza: 16 U. I. por mg) se coloca en un vaso de centrifuga y se lleva a pH 4,7-5 (precipitación máxima). Se centrifuga y el sobrenadante se elimina. El precipitado se suspende en buffer de fosfatos (150 cm³ de PO₄Na₂H M/15 y 150 cm³ de PO₄H₂K - M/15). Se acidifica con HCl hasta pH 2,5 en que se disuelve la insulina. Se agrega a la solución 7 cm³ de ZnCl₂ al 0,5 % y luego 70 cm³ de acetona. Luego se lleva la reacción a pH 6,6-6,8 con amoníaco al 10% rápidamente.

Una turbidez pequeña queda sin desaparecer y a los pocos instantes se comprueba la formación de cristales de insulina en forma de cubos característicos. Se lleva el pH a 6,5-6,4 con HCl al 10 % y se deja en reposo en cámara fría a 1° durante 8 días.

Se centrifuga, se elimina el líquido sobrenadante y el precipitado se seca lavando con acetona. Rendimiento 4,3 g — 95.000 U. I. (79 %). En otros en-

¹ A. D. Scott. *Biochemical J.*, vol. 28, pág. 384 (1934).

sayos de cristalización en que se partió de insulina más impura el rendimiento fué algo menor (70 %).

Compuestos insolubles

El hallazgo de compuestos insolubles de insulina con ciertas sustancias de naturaleza proteica que se solubilizan lentamente a pH fisiológico indujo a varios autores (HAGERDORN, JENSEN, KRARUP, NORDSTRUP, etc.) a buscar el de menor solubilidad, encontrando que las protaminas precipitan a la insulina a pH 7 dando un compuesto muy poco soluble a dicho pH, lo que los llevó a ensayar sus efectos.

La acción hipoglucémica de la insulina protamina es más prolongada que la de la insulina común a igualdad de dosis y el descenso de la glucosa sanguínea se hace en forma más lenta.

La dificultad de conseguir en nuestro país materia prima para la obtención de protamina hizo que se buscara una sustancia que teniendo propiedades semejantes a ella no presentara los inconvenientes de su preparación en lo que respecta a materia prima; encontrándose que la histona produce con la insulina un precipitado cuando se lleva su solución a pH 7. Este compuesto insulina-histona tiene una acción sobre la glucemia semejante a la de la insulina protamina (trabajo 8).

La histona utilizada por nosotros fué preparada partiendo de timo, siguiendo el método de FELIX y HARTENECK descrito en el libro de KOSSEL.

Preparación de insulina-histona

La preparación de insulina-histona se realizó disolviendo 2 g de histona en 500 cm³ de fosfato monopotásico M/15 y añadiendo esta solución a 4000 cm³ de insulina de 50 U. I. por cm³, la cual estaba a pH 2,8-3.

La solución límpida resultante se filtra estérilmente por filtro SEITZ y luego se envasa en ampollas de tal manera que cada una de ellas contenga 4,5 cm³ de esta solución (200 U. I. en total).

Se prepara aparte una solución «buffer» de fosfato disódico M/15 que se envasa en ampollas (0,6-0,7 cm³ en cada una). Estas se esterilizan por tyndalización a 100° durante 90 minutos.

Para la obtención del compuesto insoluble insulina-histona se añade 0,5 cm³ de esta solución «buffer» a una ampolla de insulina-histona. El pH resultante es de 6,8-7. Se produce un precipitado blanco abundante. Por agitación se obtiene una suspensión que contiene 40 U. I. por cm³.

Insulina-protamina

Se prepara en forma análoga a la insulina-histona.

Se disuelve la protamina en una mezcla «buffer» de fosfatos a pH 7,3-7,4 en una concentración de 0,4 %. Se filtra estérilmente por filtro SEITZ y se envasa en ampollas de 1 cm³.

Se prepara una solución de insulina que contenga 50 U. I. por cm³ a pH 3, se filtra estérilmente a través de bujía y se envasa en ampollas de forma que cada una contenga 4 cm³ (200 U. I.). Al introducir 1 cm³ de la solución de protamina en la ampolla de insulina se produce un precipitado blanco de insulina-protamina. El pH resultante es de 6,8-7.

NOTAS

- (1) Esto es de importancia, pues la insulina es destruída por acción enzimática. En el Instituto Bacteriológico los páncreas se elaboran dentro de las 6 horas de extraídos.
- (2) El recipiente donde se hace la extracción, así como los demás utilizados en otras operaciones, no deben tener metal en contacto con los líquidos.
- (3) Si no se dispone de éstos, o de filtros prensa adecuados, se pueden utilizar filtros de papel plegado donde la filtración es naturalmente mucho más lenta, y en los cuales no se requiere el empleo de supercel.
- (4) Esto es importante, pues cuando se extrae con el alcohol-ácido la pasta demasiado húmeda y el tiempo de extracción es corto el rendimiento disminuye notablemente.
- (5) El residuo se elimina, pues no tiene actividad de importancia como para recuperarla.
- (6) A 0°-4° se forman a veces cristales de sulfato de sodio que molestan en la disolución posterior.
- (7) Se toma como punto final el pH de máxima precipitación. En este punto, el líquido sobrenadante no debe dar turbidez por añadido de NaOH o de HCl.

Trabajos sobre preparación de la insulina y derivados realizados en el Instituto Bacteriológico del D. H. N.:

- 1°) A. SORDELLI y V. DEULOFEU, « Método de preparación de insulina ». Rev. Asoc. Méd. Arg., vol. 36, 89 (1923). Comp. rend. Soc. Biol. 89, 743, (1923).
- 2°) A. SORDELLI, « Métodos para la preparación de la insulina ». Rev. Asoc. Méd. Arg., vol. 36, pág. 284 (1923). Comp. rend. Soc. Biol., vol. 90, 254 (1924).
- 3°) A. SORDELLI, R. WERNICKE y V. DEULOFEU, « Preparación de la insulina ». Actas del II Congreso Sudamericano de Química, vol. IV, pág. 161 (1924).
- 4°) R. WERNICKE, « Método de preparación de insulina », Rev. Asoc. Méd. Arg. 37, 89 (1924). Comp. rend. Soc. Biol., vol. 91, 320 (1924).
- 5°) A. SORDELLI, « Preparación de la insulina ». Rev. Inst. Bact. D. N. H., vol. 4, 393 (1926). An. Asoc. Quím. Arg., vol. 15, pág. 57 (1927).
- 6°) F. MODERN, O. SCOTT y R. WERNICKE, « Medición biológica de la insulina ». Rev. Inst. Bact. D. N. H., vol. 4, pág. 591 (1926). Comp. rend. Soc. Biol. 97, 1244 (1927).
- 7°) N. LARA, « Precipitación de la insulina en solución acuosa por el ácido clorhídrico ». Folia Biológica, Nos. 31-33, pág. 141 (1933).
- 8°) A. BIASOTTI, V. DEULOFEU y J. R. MENDIVE, « Acción de la insulina-histona sobre la glucemia. Su empleo en el tratamiento de la diabetes humana ». Prensa Médica Argentina, 24, pág. 1122 (1937).