

Dosaje de la Urea por la ureasa

POR EL DR. MANUEL A. VELASQUEZ

Profesor de Química Médica en la Facultad de Medicina

Al lado de los métodos de dosificación de la úrea que se basan en la acción del ácido nitroso, de los hipocloritos o de los hipobromitos, existen otros procedimientos basados, en las propiedades de algunas bacterias (*micrococcus urae*) de descomponer la úrea en anhídrido carbónico y amoniaco, gracias a que la orina, colocada a la temperatura ambiente, sirve como de medio de cultivo en el que se desarrollan estas bacterias. Sin embargo, la misma descomposición en anhídrido carbónico y amoniaco puede obtenerse por la ebullición con los álcalis o calentando por varias horas a 150° la úrea con los ácidos. (*)

Los trabajos de PASTEUR y de VAN THIEGEN sobre la fermentación amoniacal de la orina, fueron perfectamente aclarados, cuando MUSCULUS en 1874 descubrió un fermento capaz de descomponer la úrea en amoniaco y anhídrido carbónico y propuso un método de dosage, basado en el empleo del papel de filtro, sobre el que se ha filtrado una orina en fermentación amoniacal; a los 50° la transformación de la úrea en carbonato de amoniaco es rápida y completa, pudiendo en consecuencia dosarse este compuesto por alcalimetría.

(*) No todos los cuerpos que pertenecen al grupo de los ureidos, cuyo prototipo es la úrea, gozan de la propiedad de descomponerse por los hipobromitos alcalinos. El veronal o ácido dietilbarbitúrico es uno de ellos pues es necesario que actúe previamente un álcali concentrado en caliente.

El *micrococcus urae* al actuar sobre el veronal lo descompone primero en úrea y ácido dietilmalónico, disminuyendo poco a poco la acidez de la solución por la formación de carbonato de amoniaco.

El *aspergillus niger* y el *Penicillium glaucum* no desdoblan el veronal, aunque si se desarrollan en las soluciones de estas sustancias.

MIQUEL obtuvo una diastasa, cultivando en un medio peptonado las bacterias *ureófaqas* y el profesor BOURQUELOT (Tesis de París 1889) dió el nombre de *ureasa* al fermento hidrolizador de la úrea.

SHIBATA (1904) ha encontrado la *ureasa* en el *aspergillus niger* y KIKKOJI (1907) en el *corticellus edodes*.

Pero ha sido TAKEUCHI quien en 1909 encontró la fuente de ureasa más importante, estudiando una leguminosa llamada soja (*soja hispida*). (1) KEISEL en 1911, ZEMPLÉN en 1912 y ANNET en 1913 han aislado el fermento *ureasa* de diversas plantas: trigo, lupino.

(1) La Soja es la semilla de una leguminosa, muy usada en el Japón, China y en la Corea como alimento.

Es de gran valor nutritivo como lo manifiesta su composición química:

Materias grasas	17—18 %
Id. nitrogenadas	33—37 %
Id. Hidratos de carbono	20 %

Contiene más materias albuminoideas que la carne y el trigo.

En el Japón se prepara un queso, con el arroz fermentado y la Soja, que es de uso corriente y que se llama *tofu*.

Solo la Manchuria exporta 500.000 toneladas de semilla de soja, principalmente al Japón, pues en Europa en 1911 aún cuando ha aumentado su importación, no llega a esa cifra. El litoral chino hace el comercio de la Soja por valor de 130 millones de francos.

En 1873 fueron llevadas las semillas de Soja a la Exposición de Viena y entonces se comenzó una serie de importantes estudios sobre su composición química y sus aplicaciones a la agricultura.

Son dos las principales variedades de semillas que se distinguen por su forma y su color: la *soja hispida platycarpa* y la *soja hispida tumida*, siendo la de más valor nutritivo la *soja hispida tumida*, variedad *pallida*, *atroserma* o *castanea*.

Su composición química es:

Agua	10.68 %
Materias azoadas	34.08 %
Grasas	16.45 %
Hidratos de carbono.....	29.58 %
Materias leñosas	4.44 %
Cenizas	4.77 %

La *Soja Híspida* (Moench), ha sido cultivada desde la más remota antigüedad en China principalmente en la Manchuria; es una leguminosa anual, de hojas compuestas, bifoliadas, flores verdosas e incoloras, frutos vainillas o legumbres vellosas, que contienen las semillas en forma de pequeños granos semejantes a pequeñas habas, lo que le ha dado el nombre de haba oleosa de la China. Por su cultivo se mejora la calidad del terreno, por cuanto posee la planta la propiedad de fijar el Nitrógeno mejor que las demás leguminosas. La semilla de forma elipsoidea mide 9 milímetros de longitud por 6 milímetros de ancho y 4 de espesor. La superficie externa es de color variable. La variedad más común es la amarilla.

La harina de soja es la empleada como alimento; se obtiene por maceración de las semillas decorticadas, para disminuir la proporción de celulosa y aumentar su digestibilidad y mejorar el sabor.

Su composición química es:

Extracto seco	89.28
Sustancia azoada	39.90
Sustancia grasa	19.50
Sustancia hidrocarbonada.....	10.07
Sales minerales	3.18

BENJAMIN (1) ha comprobado la presencia de la ureasa en las nudosidades de las raíces de varias leguminosas, en los óvulos, el pólen, los tubérculos y los bulbos de algunas otras plantas.

La ureasa existe igualmente en las semillas de la higuera o palma cristi (*Ricinus comunis*) (2), tan abundante entre nosotros y que se le conoce vulgarmente con el nombre de «piojos del diablo».

Preparación de la ureasa.—Preferimos para la preparación de la ureasa el método de DONAL y VAN SLYKE (3) que es como sigue: se hace una maceración de harina de soja, 10 gramos en 150 gramos de agua destilada, se decanta el líquido y se agrega 10 gramos de acetona; se forma un precipitado que contiene la ureasa que se reúne en un filtro que se deseca en el vacío, sobre ácido sulfúrico.

Así aislada la ureasa, se presenta como un polvo blanco amarillento, soluble en el agua de color *sui generis* dando lugar a una solución opalina, espumosa.

Numerosos han sido los trabajos de investigación que se han hecho sobre la ureasa podemos citar entre los más importantes los de ARMSTRONG, HORTON, VAN SYLKE, CULLEN, TACHARUS quienes se han ocupado de medir la actividad del fermento, la influencia que otras sustancias podían poseer para disminuir su poder diastásico (ácidos débiles, álcalis, aminoácidos, anhídrido carbónico, alcoholes, aldehidos, glucosa etc.), llegando a comprobar que ninguna de estas sustancias tenía poder inhibitorio apreciable sobre su poder enzimático.

El mejor trabajo que sobre la ureasa se ha realizado es el de NAOSUKE ONODERA (4) del Departamento de Fisiología de la Universidad de Londres, quien ha demostrado que la ureasa de la soja

Esta harina se utiliza desde hace algunos años para fabricar un pan para los diabéticos, aplicación que se deriva de la pequeña cantidad de hidratos de carbono que contiene habiendo sido recomendada después de cuidadosas experiencias por LECHE y DUJARDIN-BEAUMETZ.

El contenido de materias amiláceas, según estos autores, es muy inferior al pan de gluten más bien preparado.

El análisis del pan de soja según varios autores, suministra la composición siguiente:

Humedad	44.87
Sustancias proteicas	24.61
Sustancias grasas	12.06
Sustancias hidrocarbonadas	10.07
Sales minerales	3.13

En los Estados Unidos emplean la soja como forraje.

(Para más detalles véase la *Enciclopedia de Química de GUARESCHI*, suplemento anual 1910-11—Pág. 303).

(1) BENJAMIN.—*Journal de Pharmacie et Chimie*. Pág. 412. Paris 1913 y pág. 259 Paris 1916.

(2) FALH.—*Journal of the American Chemical Society*.—pág. 292. 1913.

(3) DONAL and VAN SLYKE.—*The Journal of the American Medical Association* Chicago 1912.

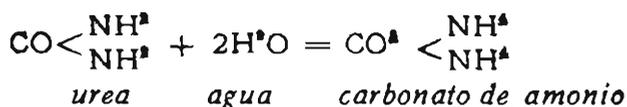
(4) NAOSUKE ONODERA.—*The Biochemical Journal*.—Diciembre 1915.

(*Soj bean*) hay una coenzima. En efecto: ha comprobado 1º. que la ureasa pierde su actividad por la diálisis, pero que la recupera por la adición de pequeña cantidad de ureasa fresca; 2º. Es muy probable que la coenzima esté constituida por dos grupos de componentes: uno dializable y otro no. El componente dializable experimenta un cambio irreversible durante la diálisis; 3º. La coenzima consta de dos partes: fija y libre; 4º. El calor y la diálisis destruyen la parte (coenzima) libre primero y la fija después. En la última porción de la fija se encuentra el precipitado producido por la diálisis y es resistente a ésta y al calor; 5º. Los efectos inhibitorios del calor, ácidos y álcalis, se ejercen sobre la coenzima y no sobre la ureasa.

Aplicación de la ureasa al dosaje de la urea.—Solo en 1913, MARSHALL (1) y después en 1914 PLIMMER y SKELTON emplearon el polvo de la semilla de soja, es decir, la ureasa para dosar la úrea en la orina la sangre, etc.

El método ha tenido acogida, porque además de la simplicidad de las operaciones, ofrece, sobre el método gazométrico del hipobromito de sodio, la ventaja de descomponer la totalidad de la úrea, sin actuar sobre los otros compuestos nitrogenados de la orina, como lo han manifestado últimamente WHITE y WILLIAMS (2).

La ureasa transforma, por hidrólisis, íntegramente la úrea en carbonato de amoníaco, de conformidad con la fórmula siguiente:



Bastará después dosar el carbonato de amoníaco formado, para obtener la cantidad de úrea contenida en la orina, sangre o cualquier otro líquido orgánico, por una simple operación de neutralización por un ácido de título conocido.

Material necesario.—4 frascos de Ehrlenmeyer de 200 c.c. de capacidad.

1 bureta de 50 c.c.

1 pipeta de 5 c.c.

1 pipeta de 1 c.c.

1 mortero de vidrio.

100 c.c. de metilorange en solución hidroalcohólica.

(1) MARSHALL.—Método de estimación de la úrea en la orina.—*Journal of Biological Chemistry*.—Nos. XIV, XV.—1913.

(2) WHITE and WILLIAMS.—*The Pharmaceutical Journal*.—1916.

1000 c.c. de solución n|10 de ácido clorhídrico.

50 c.c. de toluol

Ureasa en polvo o en comprimidos (*).

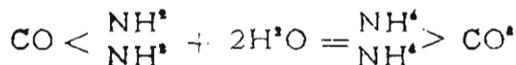
Procedimiento para el dosaje de la úrea en la orina.—Prescin-
do de las diversas modificaciones propuestas al primitivo proce-
dimiento original de MARSHALL, para indicar la técnica más simple,
cuya exactitud he comprobado con los más delicados métodos de
laboratorio.

La técnica que empleo es una ligera modificación de la pro-
puesta por M. BARTON de Georgetown en su *Manual of Vital Func-
tion Fasting Methods and their Interpretation* (1916).

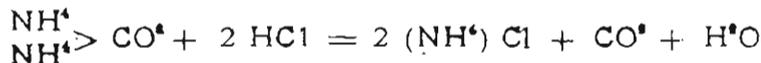
Tómese dos pomos de boca ancha de 50 cc. de capacidad; co-
lóquese en cada uno de ellos 1 cc. de orina siempre que la densidad
de ésta sea menor de 1010; en caso contrario se tomará 1 cc. de
la orina diluída al 1|5; agréguese 10 cc. de agua y 1 cc. de toluol.
Rotúlese Nos. 1 y 2. El N^o. 1 tápese y póngase a un lado. Al N^o. 2
agréguese 2 cc. de la solución de ureasa (o una pastilla triturada en
2 cc. de agua) agítese y tápese como el N^o. 1 y déjese por lo menos
 $\frac{1}{2}$ hora a la temperatura ambiente; mejor es dejarlos hasta el si-
guiente día, 18 a 20 horas, para que la transformación de la úrea
en carbonato de amoniaco sea completa, sobre todo, si se opera en
los meses de invierno.

Se agrega á ambos pomos 1 y 2 una gota de la solución de me-
tilorange y se deja caer cuidadosamente, en ambos, el ácido clorhí-
drico n|10 que se tiene en la bureta, hasta que tome una coloración
rojiza indicadora de un ligero exceso de HCl, que neutralizará el
carbonato de amoniaco formado en el pomo N^o. 2, en el que se
agregó la ureasa, e indicará el amoniaco preformado en el N^o. 1;
basta restar la cifra obtenida en éste de la que ha suministrado
el dosaje del carbonato de amoniaco, para conocer la cantidad de
úrea habida en la orina.

El fenómeno se realiza conforme a la siguiente reacción:



y la dosificación según la siguiente:

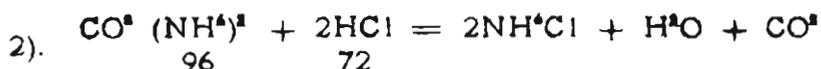
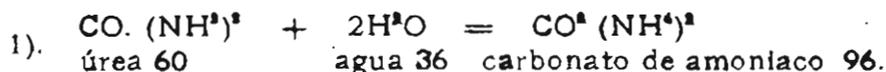


(*) Frascos de 25 grs. de Arico-Ureasa.—The Arlington Chemical Co. Yonkers
New-York.

Urease Squibb Tablets.—E. R. Squibb and Sons.—New York.

Como se vé en la primera faz de la reacción todo el nitrógeno de la úrea ha pasado a la molécula de carbonato de amonio, y en la segunda una molécula de carbonato de amonio requiere dos moléculas de HCl (monovalente) para neutralizar a aquel convirtiéndolo en cloruro de amonio, tomando el amonio y desprendiendo el anhídrido carbónico.

De estas mismas fórmulas se desprende el cálculo para la estimación de la úrea.



Luego para neutralizar 96 de carbonato de amonio (o sea 60 de úrea) se requiere 72 de ácido clorhídrico; el HCl empleado es $\frac{1}{10}$ luego esta cantidad (72 gramos) estará contenida en 20.000 cc. de agua; por consiguiente $\frac{1}{20.000}$ de 60 es igual a 0.003 ($60 : 20,000 = 0.003$).

En consecuencia cada centímetro cúbico de solución $\frac{1}{10}$ de HCl que neutralice la orina adicionada de la ureasa, menos los centímetros cúbicos gastados en la prueba en blanco (orina no adicionada de ureasa) representará 0.003 gramos de úrea.

Ejemplo.—Se ha tomado 1 cc. de orina diluída al $\frac{1}{5}$, en los dos pomos o vasos, se agrega a cada uno 10 cc. de agua añadiéndole además a uno de ellos solamente 2 c.c. de solución de ureasa; trascurrido el tiempo requerido y después de agregar la gota de metilorange se ha gastado en el primero 0. 5. cc. de HCl; en el segundo al que se agregó ureasa, se ha gastado 2,3 cc.

2,3cc.—0,5cc.—1,8cc. que multiplicado por 15 (0.003×5 dilución) da 27 gramos por litro.

Procedimiento para el dosage de la úrea en la sangre.—Desde la investigaciones de WIDAL y JAVAL se ha llegado a considerar indispensable el dosage de la úrea en la sangre, pues el complemento indispensable para juzgar de la depuración renal, en los diversos estados patológicos, se aprecia conociendo el grado de la retención de úrea en la sangre o azoemia.

La cantidad de úrea que contiene la sangre en estado normal, en estado perfecto de la función renal, oscila entre 0.15 y 0,50 grm. por litro de suero sanguíneo.

Cuando el riñón es insuficiente, la retención de úrea en la sangre puede ascender hasta 1, 2, 3 gramos y aún más.

Por consiguiente, este dosage, que la escuela francesa ha sabido poner en relieve, tiene valor indiscutible en patología; de aquí el empeño de hacerlo accesible a todos los investigadores y la oportunidad se ha presentado gracias a la introducción en la práctica analítica, del dosage de la úrea por la ureasa.

La técnica que se sigue es la siguiente:

Se extrae 5 cc. de sangre de una vena, que se recibe en un frasco o tubo que contiene 2 cc. de oxalato de sodio al 1 %, se agrega la ureasa, 1 cc. más 5 cc. agua, se deja en reposo toda la noche, o solo media hora manteniendo la temperatura a 30 grados, y luego se procede como para el dosage de la úrea en la orina, teniendo en cuenta en el cálculo final la cantidad de sangre tomada para el dosage.

Puede estimarse con ventaja sobre el *serum* sanguíneo, cuando este no está coloreado por la hemoglobina; y en el caso que estuviera se centrifuga durante 3 a 5 minutos y se obtendrá un *serum* de ligero tinte amarillento, sobre el cual se actuará, sin olvidar la cantidad de *serum* tomada.

Por todo lo dicho se deduce que este procedimiento es de fácil ejecución y de mayor exactitud que el dosage por los ureómetros en los que además de las pérdidas hay que tener en cuenta que el reactivo actúa sobre otros compuestos nitrogenados, que no son la úrea; además tiene la ventaja que la transformación de la úrea en carbonato de amoníaco es total. Por otra parte no son indispensables aparatos especiales (ureómetros, etc) que solo pueden encontrarse en los Laboratorios químicos bien equipados.

