

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUIMICA

Estudio de la influencia de la temperatura en el análisis de tripsina por el método de la hidrólisis del clorhidrato del éster etílico de la N - benzoil - L - arginina

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

LAURA ALICIA MAYNE GUTIERREZ

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

I. INTRODUCCION

- | | |
|---|----|
| 1. Enzimas | 3 |
| 2. Tripsina | 6 |
| 3. Efecto de la temperatura en reacciones catalizadas por enzimas | 11 |

II. PARTE EXPERIMENTAL

- | | |
|--|----|
| 1. Equipo | 13 |
| 2. Reactivos | 13 |
| 3. Método de valoración | 14 |
| 4. Fundamento del método de valoración | 15 |
| 5. Procedimiento | 19 |

III. RESULTADOS

- | | |
|---|----|
| 1. Análisis estadístico de los resultados obtenidos | 34 |
|---|----|

IV. CONCLUSIONES

48

V. BIBLIOGRAFIA

49

I N T R O D U C C I O N

Entre las numerosas sustancias empleadas por la industria farmacéutica en nuestro país, se encuentra la tripsina, enzima de origen animal.

La tripsina, al igual que toda materia prima utilizada en la fabricación de un medicamento, debe ser analizada antes de su empleo, durante el proceso de fabricación y en el producto terminado, así como, durante los estudios de estabilidad cuando se trata de un medicamento nuevo.

Para efectuar la valoración de esta enzima, el método más empleado es el que se basa en la relación existente entre la actividad enzimática y la velocidad inicial de la hidrólisis del clorhidrato del éster etílico de la N-benzoil-L-arginina. Durante este ensayo, deben ser controlados diversos factores, tales como, concentración de sustrato, tiempo de reacción, pH de la mezcla reaccionante, temperatura; para lo cual es necesario contar con un equipo adecuado.

La finalidad de esta tesis es estudiar los cambios que en la actividad enzimática de la tripsina, causan variaciones en la temperatura a la cual se lleva al cabo la determinación y hacer una evaluación

de los resultados obtenidos a cada una de las temperaturas seleccionadas.

E N Z I M A S

Las funciones de todos los organismos vivos dependen de reacciones químicas, las cuales se llevan al cabo, gracias a la acción de catalizadores, sin la ayuda de los cuales, se requerirían ciertas condiciones que serían incompatibles con la vida normal de una célula. Estos catalizadores biológicos son las enzimas, que reúnen cuatro propiedades fundamentales que las hacen excepcionales:

ESPECIFICIDAD

La mayoría de ellas cataliza únicamente un rango específico de reacciones, y en muchos casos, sólo catalizan una reacción.

EFICIENCIA

Casi todas las reacciones enzimáticas, en condiciones óptimas, se llevan al cabo de un 10^8 a un 10^{11} veces más rápido que las reacciones correspondientes no enzimáticas.

VERSATILIDAD

Esto es, pueden catalizar reacciones de hidrólisis, deshidratación, óxido-reducción, polimerización, por radicales libres, etc..

CONTROL

Las enzimas se encuentran sujetas a una variedad de controles celulares. Su concentración final y su velocidad de síntesis están bajo control genético. Además, se encuentran presentes, tanto en forma activa como inactiva, y son ciertos cambios en el medio ambiente los que regulan la velocidad de conversión de una forma a otra.

Para poder clasificar a las enzimas, la Unión Internacional de Bioquímica, al través de la Comisión de Enzimas, ha establecido un sistema que también sirve como base para asignar un número de código a cada una de ellas. Este número contiene cuatro elementos separados por puntos, los cuales tienen el siguiente significado:

- i) El primer número señala a cual de las seis divisiones o clases principales pertenece la enzima.
- ii) El segundo número indica la subclase.
- iii) El tercer número indica la sub-subclase.
- iv) El cuarto número señala el número de serie que la enzima tiene en la sub-subclase.

Las seis principales clases de enzimas son las siguientes:

1. OXIDOREDUCTASAS. Reacciones de óxido-reducción.
2. TRANSFERASAS. Transferencia de un grupo químico o de una molécula a otra.
3. HIDROLASAS. Ruptura hidrolítica de enlaces tipo C-O, C-N, C-C.
4. LIASAS. Adición de grupos a dobles ligaduras o viceversa.
5. ISOMERASAS. Cambios geométricos o estructurales intramoleculares.
6. LIGASAS O SINTETASAS. Condensación de dos moléculas acopladas con la hidrólisis de una unión pirofosfato de ATP o un trifosfato similar.

T R I P S I N A

Dentro de las hidrolasas se encuentran las enzimas que actúan sobre uniones peptídicas; en esta clase y subclase se encuentra clasificada la tripsina.

La tripsina es una proteinasa (enzima proteolítica, endopeptidasa) cuyo número de clasificación es el 3.4.21.4.

La principal fuente de obtención de la tripsina es el páncreas de buey, *Bos Taurus* Linné (Fam. Bovidae).

El precursor de la tripsina es el tripsinógeno, el cual es sintetizado en las células exócrinas del páncreas y es secretado al lumen del duodeno. El tripsinógeno es convertido a tripsina por medio de la enteroquinasa y también autocatalíticamente por medio de la tripsina ya formada.

El tripsinógeno es una cadena de 229 aminoácidos unidos por seis puentes disulfuro (Figura 1).

La tripsina se produce comercialmente a partir del tripsinógeno mediante una activación lenta a un pH de 8 y a 5° C, en pre-

sencia de cloruro de calcio. La tripsina así obtenida, es una mezcla que contiene principalmente β y α tripsinas.

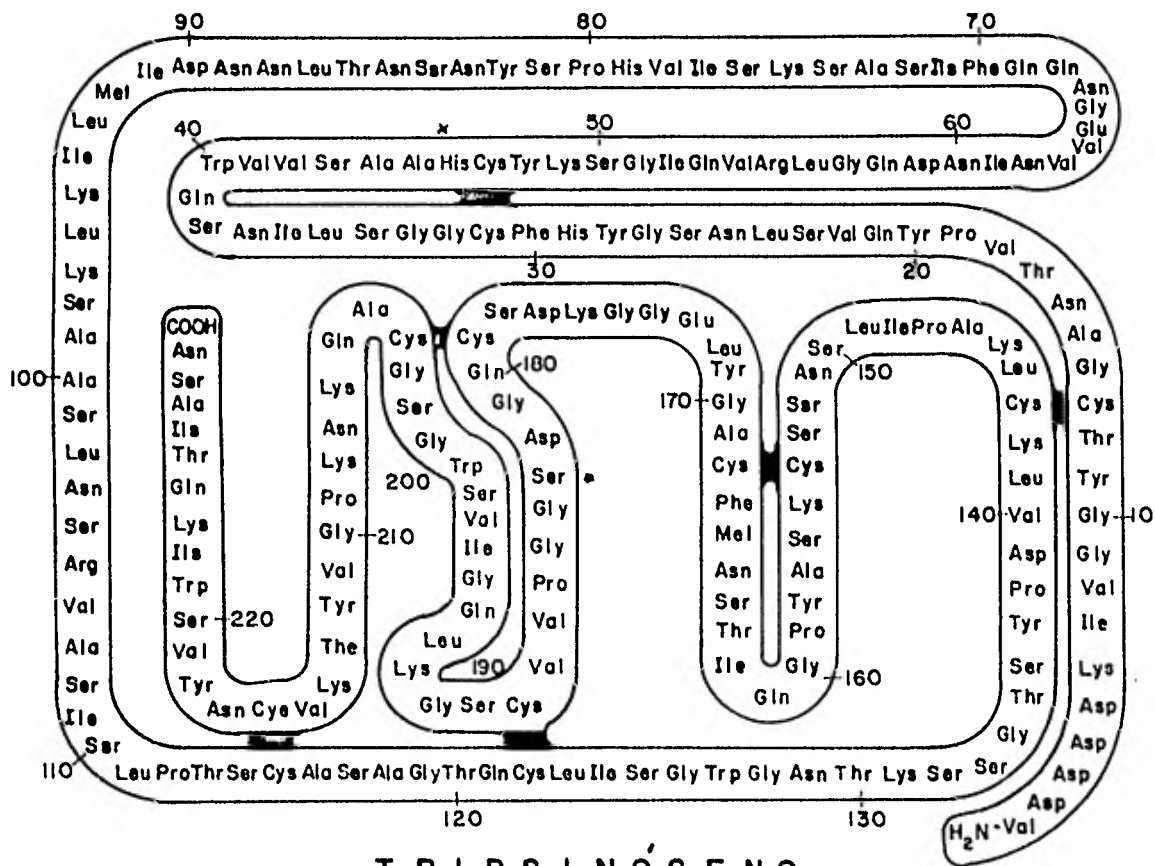
Gráficamente, la conversión de tripsinógeno a las diferentes formas de tripsina se muestra en la figura 2.

Los pesos moleculares aproximados para el tripsinógeno y las tripsinas son de 23560 - 23700.

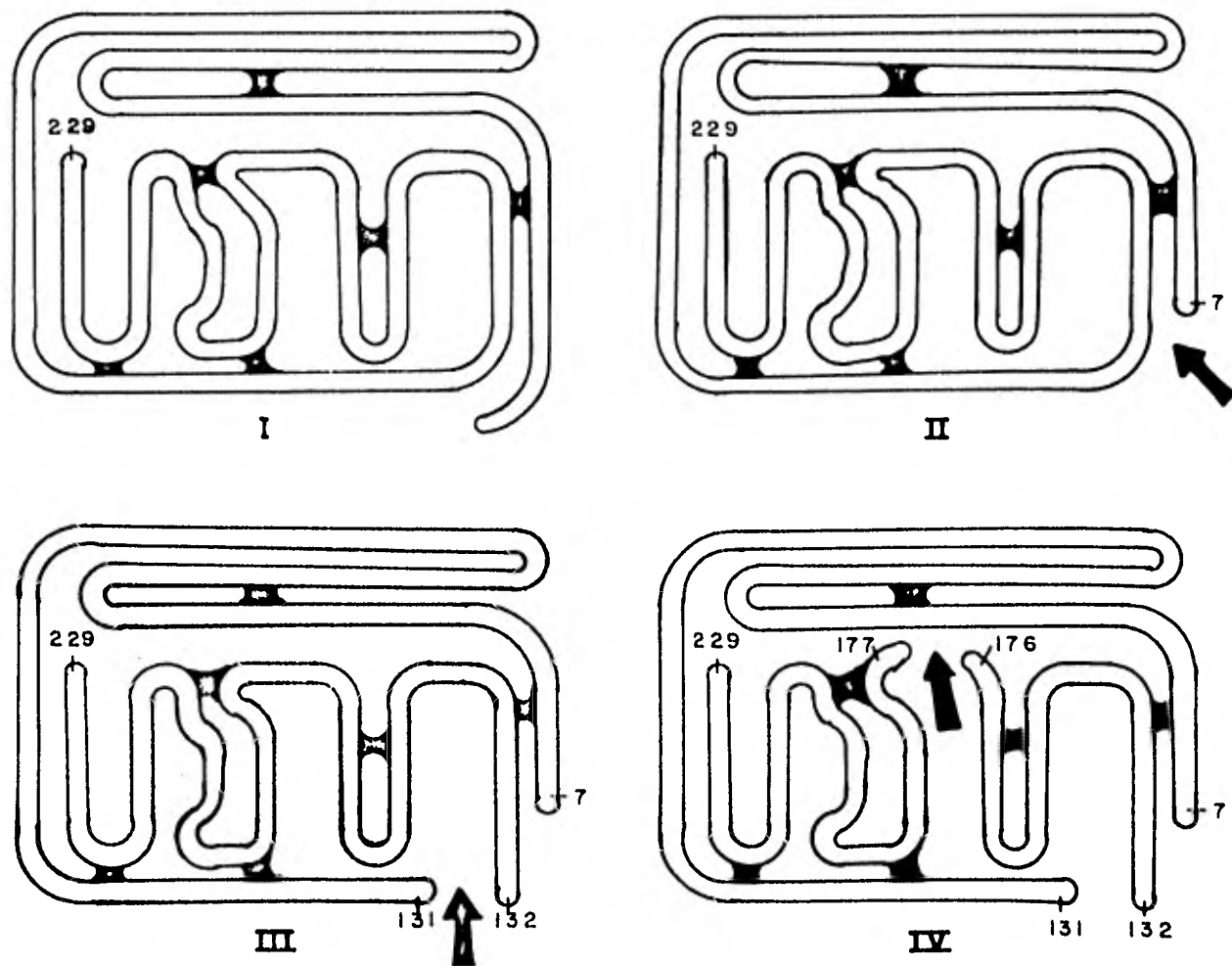
La tripsina cristalizada es un polvo amorfo o cristalino de color blanco o blanco amarillento. Su $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 15.4$ a 280 nm. Es estable indefinidamente en estado seco a temperatura ambiente. Es soluble en agua y prácticamente insoluble en alcohol.

La enzima es desnaturalizada reversiblemente por un pH arriba de 11, por precipitación con ácido tricloroacético o por altas concentraciones de urea.

La tripsina cataliza preferentemente la hidrólisis de uniones en las que se encuentra el grupo carboxilo de arginina o lisina. Los péptidos, las amidas y los ésteres de estos aminoácidos son hidrolizados en el siguiente orden: péptidos < amidas < ésteres. El pH al cual se encuentra la velocidad máxima de esta reacción es entre



TRIPSIÑOGENO
FIG. I



CONVERSION DE TRIPSINOGENO (I) A B-TRIPSINA (II), α -TRIPSINA (III) Y PSEUDOTRIPSINA (IV).

F I G. 2

7 y 9.

ACCION TERAPEUTICA

La tripsina actúa directamente para hidrolizar proteínas no afectando las células vivas, por lo tanto, es utilizada para la destrucción de tejido necrótico en heridas, úlceras, abscesos y fístulas. También es útil para la licuefacción de sangre coagulada y exudados que aún no tienen presente tejido fibroso.

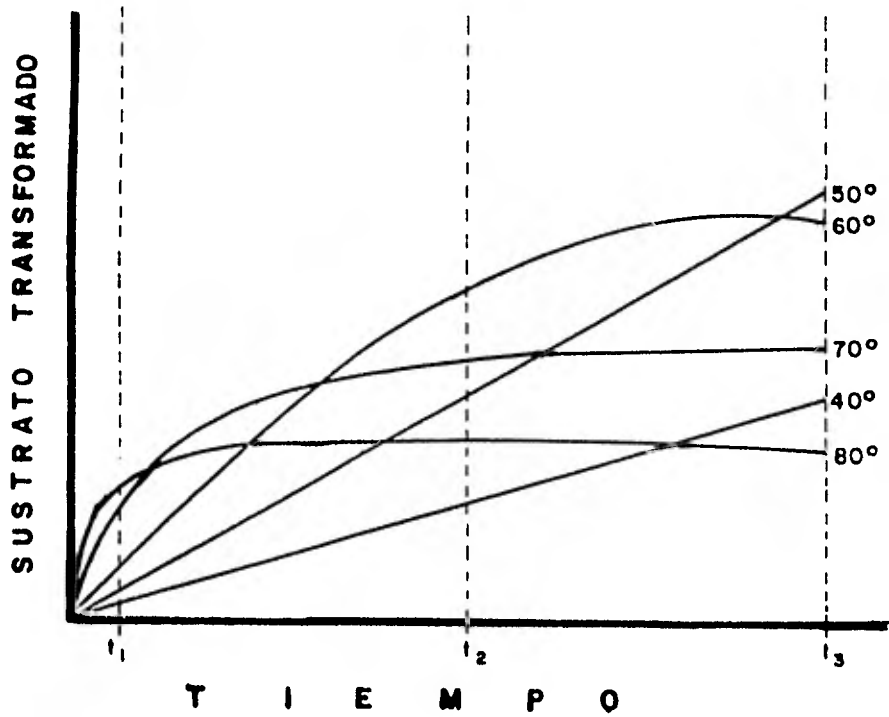
Dado su efecto irritante sobre la mucosa del tejido respiratorio, no se utiliza más ampliamente como agente mucolítico.

En combinación con quimotripsina, ha sido ampliamente utilizada para la prevención y el tratamiento de estados inflamatorios.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN REACCIONES
CATALIZADAS POR ENZIMAS

Como todas las reacciones químicas, las reacciones catalizadas por enzimas, son sensibles a cambios en la temperatura.

En la gráfica 1 se puede observar el curso de una reacción enzimática, efectuada a diversas temperaturas en función del tiempo. Un intento de determinar la temperatura óptima para esta reacción daría tres valores diferentes para cada uno de los períodos de tiempo (designados como t_1 , t_2 y t_3). Aunque la velocidad de reacción inicial parece aumentar con la temperatura hasta 80°C , el examen más cuidadoso de estas curvas, muestra que por encima de 50°C hay una caída de la actividad con el tiempo, y que la disminución es más señalada a temperaturas más elevadas. Estos resultados se deben a dos factores: un aumento en la velocidad inicial a causa del incremento e inactivación de la enzima a temperaturas más elevadas a causa de su desnaturalización.



EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN
 UNA REACCION CATALIZADA POR
 ENZIMAS.

G R A F I C A . I

P A R T E E X P E R I M E N T A L

EQUIPO

- Espectrofotómetro Pyc-Unicam, modelo 1800, UV-Visible equipado con:
 - Compartimiento termostático para celdas,
 - Sistema para graficar a longitud de onda constante.
- Baño de agua externo equipado con termoregulador y bomba.
- Termómetro para la medición de la temperatura de las celdas.
- Termómetro graduado en décimas de grado centígrado.

REACTIVOS

- Solución 0.067 M de Buffer de Fosfatos pH 7.6
Disolver 4.54 gr de fosfato de potasio monobásico en agua para hacer 500 ml de solución. Disolver 4.73 gr de fosfato de sodio dibásico anhidro en agua para hacer 500 ml de solución. Mezclar 13 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 87 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico anhidro.
- Solución Sustrato
Disolver 85.7 mg de clorhidrato del éster etílico de la N-benzoyl-L-arginina en agua para hacer 100 ml. Diluir 10 ml de esta solución con solución 0.067 M de buffer de fosfatos pH 7.6 para hacer 100 ml. Determinar la absorbancia de esta so-

lución en celdas de 1 cm a 253 nm en un espectrofotómetro adecuado, equipado con termoespaciadores para mantener la temperatura a $25 \pm 0.1^{\circ}$ C, usando agua como blanco. Mediante la adición de solución 0.067 M de buffer de fosfatos pH 7.6 ó de solución sustrato antes de diluir, ajustar la absorbancia para que mida no menos de 0.575 y no más de 0.585 . Usar esta solución en un lapso de dos horas.

- Solución Muestra de Tripsina.

Disolver una cantidad suficiente de la muestra por analizar, exactamente posada, en solución 0.001 N de HCl para obtener una solución que contenga entre 50 y 60 U USP de tripsina por ml.

METODO DE VALORACION

Medir 0.20 ml de solución 0.001 N de HCl y 3.0 ml de la solución sustrato en celdas de 1 cm. Colocar la celda en el espectrofotómetro y ajustar el instrumento para que la absorbancia lea 0.050 a 253 nm. Medir en otra celda 0.20 ml de la solución muestra de tripsina, agregar 3.0 ml de solución sustrato y colocar la celda en el espectrofotómetro (el orden de adición es importante). Al momento que se adiciona la solución sustrato, empezar a tomar el tiempo con un cronómetro y leer la absorbancia a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos. Repetir el procedimiento con la misma solu-

ción por lo menos una vez. Trazar una curva con los valores obtenidos de absorbancia contra tiempo; se deben de utilizar sólo los valores que forman una línea recta para determinar la actividad de la enzima. Si la velocidad de cambio no permanece constante por lo menos durante 3 minutos, se debe repetir el ensayo, y si es necesario, utilizar una concentración más baja de enzima.

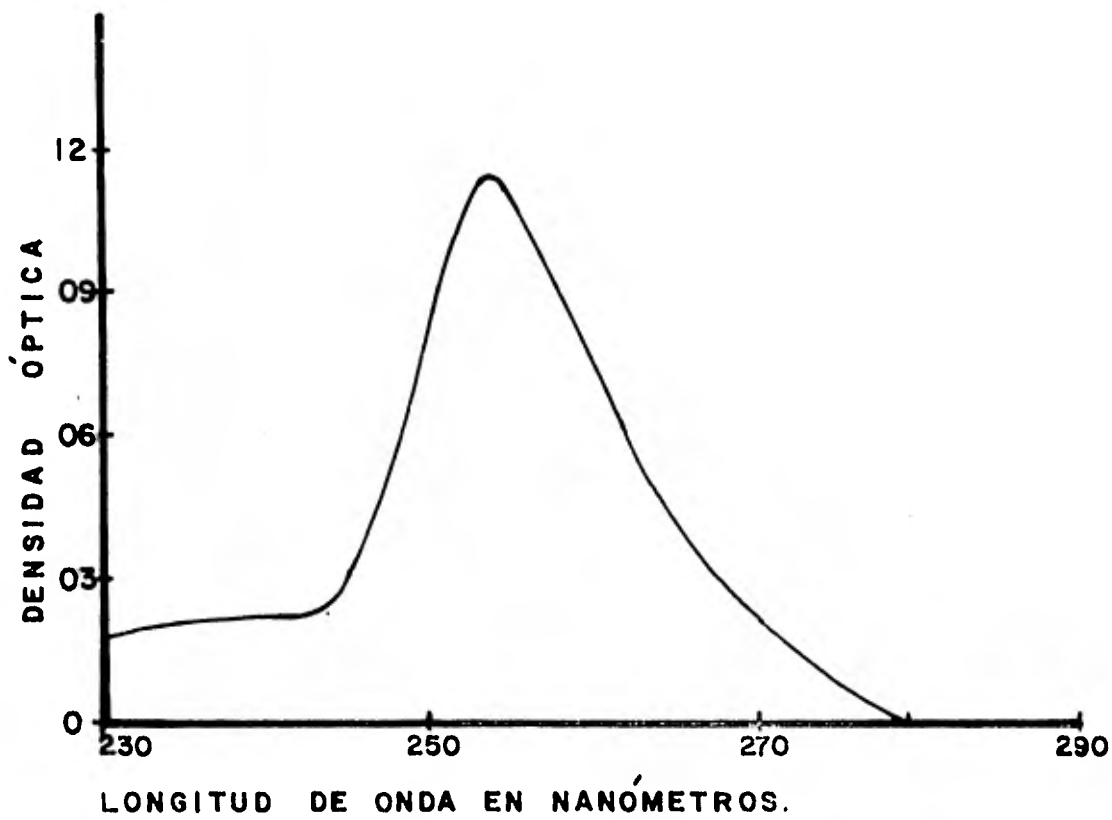
Una unidad USP de tripsina es la actividad que causa un cambio de 0.003 en la absorbancia por minuto, bajo las condiciones de reacción específica.

FUNDAMENTO DEL METODO DE VALORACION

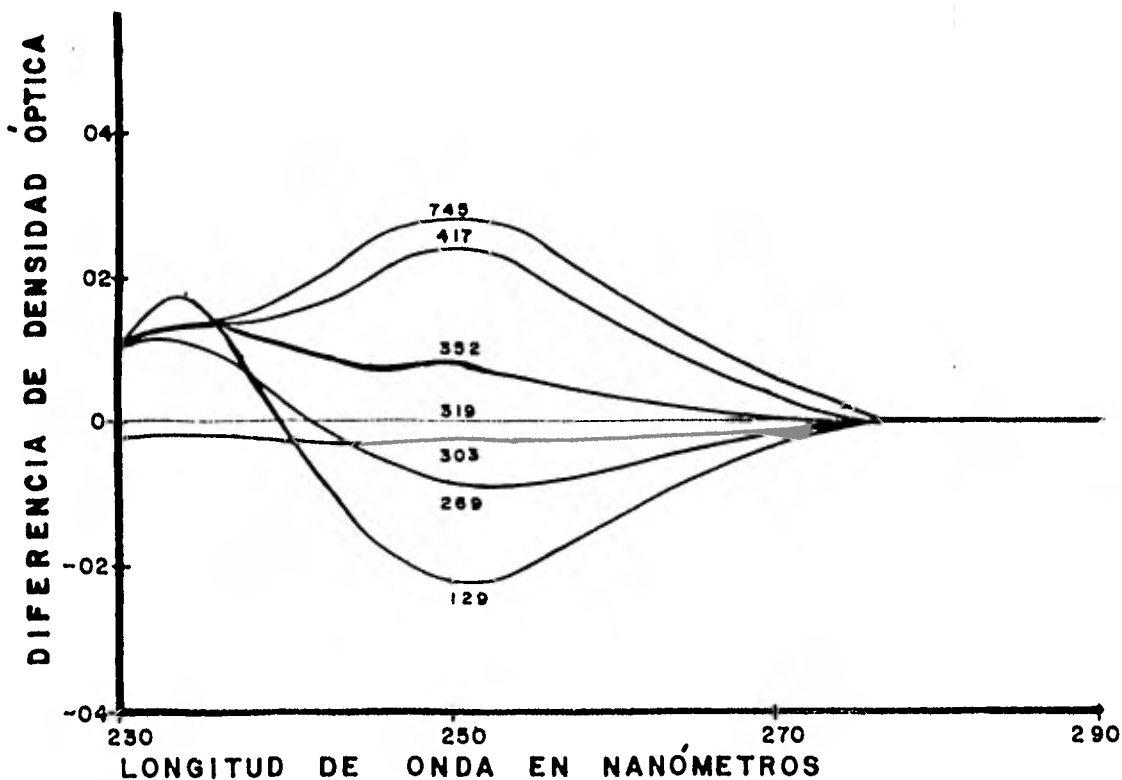
Los investigadores G. W. Schwert y Y. Takenaka, encontraron que la absorbancia del éster etílico de la N-benzoil-L-arginina, es mucho más débil a 253 nm que la de la N-benzoil-L-arginina, por lo tanto, la hidrólisis del éster puede ser seguida espectrofotométricamente (Gráfica 2).

También seleccionaron el pH al cual se debe efectuar esta reacción de acuerdo con los datos obtenidos e ilustrados en la Gráfica 3.

Además, existe una relación lineal entre la velocidad inicial de la hidrólisis y la concentración de tripsina (Gráfica 4).

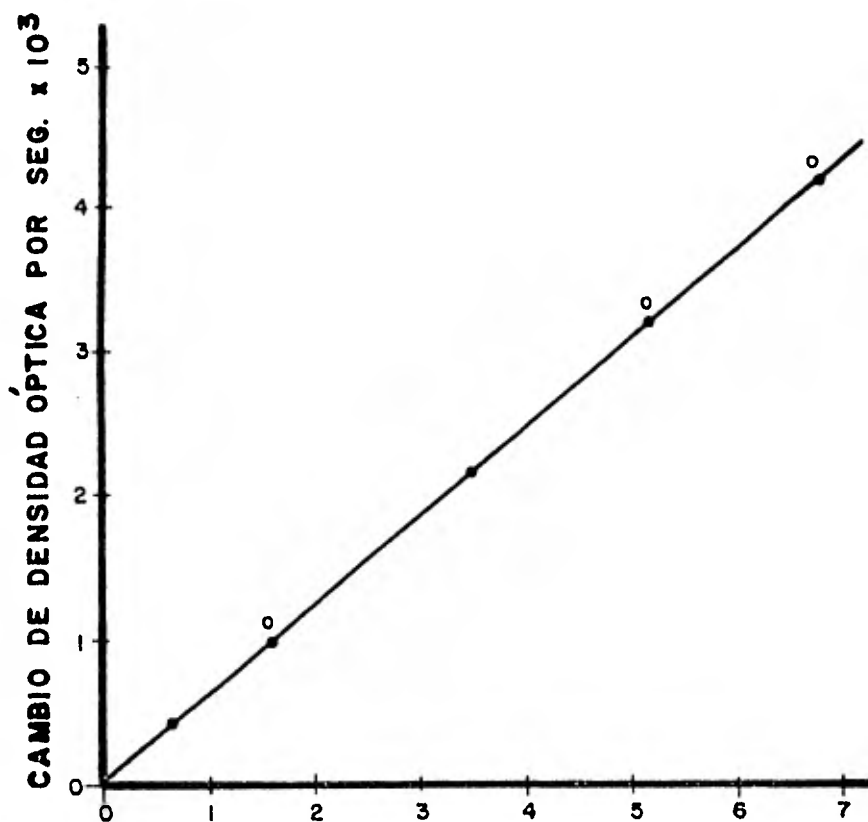


ESPECTRO DE UNA SOLUCIÓN 0.001 M DE BENZOIL
ARGININA EN BUFFER DE FOSFATOS pH 8.00
GRAFICA 2.



DIFERENTES ESPECTROS DE SOLUCIONES DE BENZOIL ARGININA A DIFERENTES VALORES DE pH CON RESPECTO A UNA SOLUCIÓN A pH 3.19

G R A F I C A . 3



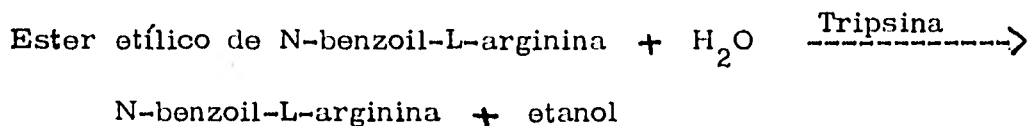
MICROGRAMOS DE TRIPSINA POR MILITRO

VARIACION DE LA VELOCIDAD INICIAL DE
HIDRÓLISIS DEL ESTER ETÍLICO DE LA
N-BENZOIL-L-ARGININA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE TRIPSINA A pH
8.00 Y 25°C.

GRAFICA 4

La velocidad de esta reacción puede determinarse mediante lecturas de absorbancia a intervalos de tiempo regulares

La fórmula para esta reacción es:



El uso de sustratos sintéticos para la determinación de la actividad enzimática de la tripsina, tiene la gran ventaja de su mayor especificidad, siendo la principal desventaja, el requerimiento de un espectrofotómetro equipado con un compartimiento para celdas, capaz de ser mantenido a temperatura constante.

PROCEDIMIENTO

La muestra con la que se efectuó este trabajo fue Zymolean XIR, lote número 4-82 de Canafarma, S. A., con un contenido teórico de tripsina de 1588 U USP/mg. El método de valoración indica que debe utilizarse una cantidad de enzima, tal que, en la dilución final se tenga una concentración teórica de tripsina entre 50 y 60 U USP/ml, por lo que se estableció trabajar de acuerdo al siguiente procedimiento:

Tomar una muestra entre 36.0 y 38.0 mg, pesarla exactamente y disolverla en suficiente solución 0.001 N de HCl para tener 100 ml. De esta solución, tomar 5 ml y llevarlos a 50 ml con solución 0.001 N de HCl. La concentración teórica de esta solución está entre 57.2 y 60.3 U USP/mg. Con esta solución, que es la solución muestra de tripsina, se siguió el método de valoración antes mencionado. Cabe señalar, que para cada determinación, se efectuó una pesada diferente.

Es importante mencionar, que tanto la temperatura en las celdas, como en el baño de agua, se mantuvo con una variación de $\pm 0.1^{\circ}$ C con respecto a la temperatura que se estuviera trabajando, ésto es, 20° C, 25° C, 30° C ó 37° C.

R E S U L T A D O S

Con los datos de absorbancia y tiempo, obtenidos para cada una de las determinaciones efectuadas a las diferentes temperaturas y utilizando la siguiente fórmula:

$$U \text{ USP/mg} = \frac{(A_1 - A_2)}{0.003 \ tW}$$

en donde:

- A_1 - Lectura de absorbancia al tiempo final
- A_2 - Lectura de absorbancia al tiempo inicial
- t - Tiempo transcurrido entre la lectura inicial y la lectura final, en minutos
- W - Peso en mg de la enzima que se está analizando en el volumen de solución utilizado en el análisis,

se obtuvieron los siguientes resultados:

T A B L A 1
TEMPERATURA 20° C

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	U USP/mg
						Promedio
1.	0.123	0.080	2	0.00800	895.8	906.2
	0.112	0.090	1		916.6	
2.	0.120	0.073	2	0.00800	979.2	916.7
	0.148	0.107	2		854.2	
3.	0.130	0.085	2	0.00796	942.2	932.0
	0.106	0.084	1		921.3	
4.	0.123	0.101	1	0.00804	912.1	932.8
	0.125	0.102	1		953.6	
5.	0.168	0.127	2	0.00794	860.6	934.1
	0.094	0.070	1		1007.5	
6.	0.123	0.079	2	0.00796	921.3	942.3
	0.125	0.079	2		963.2	
7.	0.122	0.099	1	0.00804	953.6	974.3
	0.128	0.080	2		995.0	
8.	0.117	0.068	2	0.00792	1031.1	978.5
	0.140	0.118	1		926.0	
9.	0.169	0.122	2	0.00806	971.8	982.2
	0.094	0.070	1		992.5	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
10.	0.155	0.109	2	0.00796	963.2	984.1
	0.084	0.060	1		1005.0	
11.	0.146	0.100	2	0.00794	965.6	986.6
	0.093	0.069	1		1007.5	
12.	0.121	0.072	2	0.00796	1026.0	994.6
	0.108	0.085	1		963.2	
13.	0.133	0.088	2	0.00794	944.6	997.1
	0.085	0.060	1		1049.5	
14.	0.113	0.063	2	0.00800	1041.6	1000.0
	0.122	0.099	1		958.3	
15.	0.123	0.075	2	0.00796	1005.0	1005.0
	0.104	0.080	1		1005.0	
16.	0.171	0.122	2	0.00804	1015.7	1015.7
	0.142	0.093	2		1015.7	
17.	0.119	0.070	2	0.00800	1020.8	1020.8
	0.121	0.072	2		1020.8	
18.	0.100	0.076	1	0.00796	1005.0	1026.0
	0.112	0.087	1		1047.0	
19.	0.172	0.124	2	0.00794	1007.5	1049.5
	0.102	0.076	1		1091.5	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
20.	0.159	0.110	2	0.00802	1018.3	1091.0
	0.094	0.066	1		1163.7	

T A B L A 2
TEMPERATURA 25° C

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	U USP/mg
						Promedio
1.	0.104	0.019	3	0.00804	1174.6	1174.7
	0.107	0.022	3		1174.7	
2.	0.185	0.112	3	0.00716	1132.8	1187.2
	0.148	0.068	3		1241.5	
3.	0.122	0.064	2	0.00806	1199.3	1209.6
	0.143	0.084	2		1220.0	
4.	0.120	0.028	3	0.00806	1268.3	1223.5
	0.107	0.050	2		1178.6	
5.	0.142	0.083	2	0.00790	1244.7	1255.3
	0.110	0.050	2		1265.8	
6.	0.112	0.053	2	0.00794	1238.5	1259.5
	0.124	0.063	2		1280.4	
7.	0.151	0.099	2	0.00686	1263.3	1275.5
	0.115	0.062	2		1287.6	
8.	0.170	0.078	3	0.00800	1277.7	1277.7
	0.115	0.023	3		1277.7	
9.	0.148	0.086	2	0.00800	1291.6	1281.2
	0.119	0.058	2		1270.8	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	U USP/mg
						Promedio
10.	0.109	0.047	2	0.00804	1285.2	1295.5
	0.093	0.030	2		1305.9	
11.	0.133	0.070	2	0.00804	1306.0	1295.6
	0.107	0.076	1		1285.2	
12.	0.077	0.046	1	0.00794	1301.4	1312.0
	0.119	0.056	2		1322.4	
13.	0.181	0.118	2	0.00794	1322.4	1312.0
	0.111	0.080	1		1301.4	
14.	0.176	0.081	3	0.00800	1319.4	1316.0
	0.116	0.053	2		1312.5	
15.	0.153	0.090	2	0.00790	1329.1	1318.5
	0.107	0.045	2		1308.0	
16.	0.154	0.091	2	0.00800	1312.5	1343.8
	0.124	0.091	1		1375.0	
17.	0.173	0.108	2	0.00796	1361.0	1350.5
	0.137	0.073	2		1340.0	
18.	0.196	0.131	2	0.00800	1354.2	1364.6
	0.102	0.069	1		1375.0	
19.	0.178	0.052	4	0.00768	1367.2	1376.8
	0.168	0.105	2		1386.4	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	U USP/mg Promedio
20.	0.168	0.100	2	0.00810	1399.2	1388.9
	0.137	0.070	2		1378.6	
21.	0.208	0.143	2	0.00786	1378.3	1388.9
	0.123	0.090	1		1399.5	
22.	0.140	0.072	2	0.00806	1406.1	1406.1
	0.079	0.045	1		1406.1	
23.	0.143	0.077	2	0.00792	1388.8	1410.0
	0.094	0.060	1		1431.0	
24.	0.205	0.134	2	0.00816	1450.0	1440.0
	0.110	0.075	1		1429.7	
25.	0.198	0.127	2	0.00798	1482.8	1472.4
	0.104	0.069	1		1462.0	

T A B L A 3
 TEMPERATURA 30° C

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
1.	0.210	0.100	3	0.00796	1535.5	1521.5
	0.202	0.130	2		1507.5	
2.	0.210	0.134	2	0.00806	1571.5	1571.5
	0.160	0.122	1		1571.5	
3.	0.176	0.138	1	0.00796	1591.3	1597.3
	0.130	0.092	1		1603.3	
4.	0.231	0.192	1	0.00796	1633.2	1654.1
	0.170	0.130	1		1675.0	
5.	0.214	0.174	1	0.00804	1658.4	1672.2
	0.223	0.101	3		1686.0	
6.	0.192	0.151	1	0.00796	1717.0	1717.0
	0.170	0.129	1		1717.0	
7.	0.244	0.204	1	0.00800	1666.6	1770.8
	0.190	0.100	2		1875.0	
8.	0.193	0.149	1	0.00804	1824.2	1782.8
	0.240	0.198	1		1741.3	
9.	0.184	0.142	1	0.00796	1758.8	1800.6
	0.198	0.154	1		1842.5	

No.	A_1	A_2	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
10.	0.203	0.118	2	0.00800	1770.8	1802.0
	0.150	0.106	2		1833.3	
11.	0.204	0.161	1	0.00800	1791.6	1833.3
	0.145	0.100	1		1875.0	
12.	0.162	0.117	1	0.00800	1875.0	1833.3
	0.190	0.147	1		1791.6	
13.	0.216	0.172	1	0.00800	1833.3	1833.3
	0.141	0.097	1		1833.3	
14.	0.226	0.142	2	0.00796	1758.8	1842.5
	0.155	0.109	1		1926.3	
15.	0.154	0.109	1	0.00798	1879.7	1858.6
	0.185	0.141	1		1838.0	
16.	0.214	0.167	1	0.00798	1936.2	1879.7
	0.142	0.099	1		1796.2	
17.	0.232	0.186	1	0.00804	1907.1	1886.4
	0.236	0.101	3		1865.7	
18.	0.250	0.112	3	0.00798	1921.5	1890.2
	0.191	0.102	2		1858.8	
19.	0.142	0.098	1	0.00800	1833.3	1916.6
	0.172	0.124	1		2000.0	

No.	A_1	A_2	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
20.	0.189	0.098	2	0.00796	1905.4	1936.8
	0.129	0.082	1		1968.2	
21.	0.138	0.091	1	0.00798	1963.2	1942.4
	0.185	0.139	1		1921.5	
22.	0.179	0.135	1	0.00792	1936.0	1957.0
	0.119	0.072	1		1978.1	
23.	0.237	0.190	1	0.00804	1948.6	1969.3
	0.191	0.143	1		1990.0	

T A B L A 4
TEMPERATURA 37° C

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
1.	0.259	0.103	3	0.00804	2155.8	2301.0
	0.222	0.104	2		2446.1	
2.	0.199	0.140	1	0.00796	2470.7	2366.0
	0.197	0.089	2		2261.3	
3.	0.140	0.084	1	0.00800	2333.3	2375.0
	0.208	0.150	1		2416.6	
4.	0.230	0.172	1	0.00804	2404.6	2425.4
	0.173	0.114	1		2446.1	
5.	0.162	0.098	1	0.00800	2666.6	2583.3
	0.170	0.110	1		2500.0	
6.	0.244	0.183	1	0.00800	2541.6	2593.7
	0.249	0.122	2		2645.8	
7.	0.249	0.122	2	0.00804	2632.7	2602.0
	0.182	0.120	1		2570.5	
8.	0.252	0.189	1	0.00804	2612.0	2612.0
	0.271	0.208	1		2612.0	
9.	0.172	0.110	1	0.00804	2570.5	2612.0
	0.184	0.120	1		2653.4	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	
					U USP/mg	Promedio
10.	0.215	0.150	1	0.00808	2681.5	2702.1
	0.139	0.073	1		2722.7	
11.	0.157	0.094	1	0.00796	2658.2	2711.0
	0.230	0.164	1		2763.8	
12.	0.261	0.196	1	0.00800	2708.3	2750.0
	0.192	0.125	1		2791.6	
13.	0.260	0.193	1	0.00800	2791.6	2750.0
	0.260	0.130	2		2708.3	
14.	0.218	0.152	1	0.00800	2750.0	2750.0
	0.150	0.084	1		2750.0	
15.	0.171	0.103	1	0.00796	2847.5	2763.7
	0.164	0.100	1		2680.0	
16.	0.150	0.082	1	0.00808	2805.3	2784.6
	0.142	0.075	1		2764.0	
17.	0.181	0.114	1	0.00800	2791.6	2791.6
	0.182	0.115	1		2791.6	
18.	0.180	0.110	1	0.00800	2916.6	2812.5
	0.254	0.189	1		2708.3	
19.	0.202	0.133	1	0.00800	2875.0	2833.3
	0.217	0.150	1		2791.6	

No.	A ₁	A ₂	t	W	U USP/mg	U USP/mg Promedio
20.	0.177	0.109	1	0.00804	2819.2	2860.7
	0.250	0.180	1		2902.2	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para llevar al cabo los cálculos de media, desviación standard, error standard, límite de confianza de la media y coeficiente de variación de los resultados obtenidos a las cuatro temperaturas seleccionadas para desarrollar este trabajo, se utilizaron las siguientes fórmulas y los datos que se encuentran en las tablas 1, 2, 3 y 4.

Media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Desviación Standard:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Error Standard:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Límites de confianza de la media:

$$\bar{x} \pm t s_{\bar{x}}$$

Coefficiente de variación:

$$cv = \frac{s}{\bar{x}}(100)$$

en donde:

x_i - Valor de U USP/mg

n - Número de valoraciones efectuadas

t - Valor obtenido en tablas para una
confiabilidad del 95 % y grados de
libertad igual a $n - 1$

T A B L A 5
TEMPERATURA 20° C

No.	U USP/mg		Porcentajes	
	de muestra		respecto a	
	x	$\%x$	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1.	906.2	92.14	-77.3	5975.29
2.	916.7	93.20	-66.8	4462.24
3.	932.0	94.76	-51.5	2652.25
4.	932.8	94.84	-50.7	2570.49
5.	934.1	94.97	-49.4	2440.36
6.	942.3	95.80	-41.2	1697.44
7.	974.3	99.06	- 9.2	84.64
8.	978.5	99.50	- 5.0	25.00
9.	982.2	99.86	- 1.3	1.69
10.	984.1	100.06	0.6	0.36
11.	986.6	100.31	3.1	9.61
12.	994.6	101.12	11.1	123.21
13.	997.1	101.38	13.6	184.96
14.	1000.0	101.67	16.5	272.25
15.	1005.0	102.18	21.5	462.25
16.	1015.7	103.27	32.2	1036.84
17.	1020.8	103.80	37.3	1391.29

No.	x	%x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
18.	1026.0	104.32	42.5	1806.25
19.	1049.5	106.71	66.0	4356.00
20.	1091.0	110.90	107.5	11556.25

$$\bar{x} = \frac{19669.5}{20} = 983.5 \text{ U USP/mg}$$

$$s = \sqrt{\frac{41099.67}{19}} = \sqrt{2163.14} = 46.51$$

$$\frac{s}{\bar{x}} = \frac{46.51}{\sqrt{20}} = \frac{46.51}{4.47} = 10.40$$

Límite de confianza de la media:

$$985.3 \pm (2.093)(10.40)$$

$$985.3 \pm 21.77$$

Coefficiente de variación:

$$cv = \frac{77.4}{1317.4}(100) = 5.87$$

T A B L A 0
TEMPERATURA 25° C

No.	U USP/mg	Porcentajes		
	de muestra	respecto a la \bar{x}		
	x	%x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
1.	1174.7	89.2	-142.7	20363.29
2.	1187.2	90.1	-130.2	16952.04
3.	1209.6	91.8	-107.8	11620.84
4.	1223.5	92.8	- 93.9	8817.21
5.	1255.3	95.3	- 62.1	3856.41
6.	1259.5	95.6	- 57.9	3352.41
7.	1275.5	96.8	- 41.9	1755.61
8.	1277.7	97.0	- 39.7	1576.09
9.	1281.2	97.3	- 36.2	1310.44
10.	1295.5	98.3	- 21.9	479.61
11.	1295.6	98.3	- 21.8	475.24
12.	1312.0	99.6	- 5.4	29.16
13.	1312.0	99.6	- 5.4	29.16
14.	1316.0	99.9	- 1.4	1.96
15.	1318.5	100.1	1.1	1.21
16.	1343.8	102.0	26.4	696.96
17.	1350.5	102.5	33.1	1095.61

No.	x	$\%x$	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
18.	1364.6	103.6	47.2	2227.84
19.	1376.8	104.5	59.4	3528.36
20.	1388.9	105.4	71.5	5112.25
21.	1388.9	105.4	71.5	5112.25
22.	1406.1	106.7	88.7	7867.69
23.	1410.0	107.0	92.6	8574.76
24.	1440.0	109.3	122.6	15030.76
25.	1472.4	111.7	155.0	24025.00

$$\bar{x} = \frac{32935.8}{25} = 1317.4 \text{ U USP/mg}$$

$$s = \sqrt{\frac{143892.16}{24}} = \sqrt{5995.5} = 77.4$$

$$s_x = \frac{77.4}{\sqrt{25}} = \frac{77.4}{5} = 15.48$$

Límite de confianza de la media:

$$1317.4 \pm (2.06)(15.48)$$

$$1317.4 \pm 31.88$$

Coefficiente de Variación:

$$cv = \frac{77.4}{1317.4}(100) = 5.87$$

T A B L A 7
TEMPERATURA 30° C

No.	U USP/mg	Porcentajes		
	de muestra	respecto a la \bar{x}		
	x	%x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
1.	1521.5	84.4	-281.5	79242.25
2.	1571.5	87.2	-231.5	53592.25
3.	1597.3	88.6	-205.7	43312.49
4.	1654.1	91.7	-148.9	22171.21
5.	1672.2	92.7	-130.8	17108.64
6.	1717.0	95.2	- 86.0	7396.00
7.	1770.8	98.2	- 32.2	1036.84
8.	1782.8	98.8	- 20.2	408.04
9.	1800.6	99.8	- 2.4	5.76
10.	1802.0	99.9	- 1.0	1.00
11.	1833.3	101.7	30.3	918.09
12.	1833.3	101.7	30.3	918.09
13.	1833.3	101.7	30.3	918.09
14.	1842.5	102.2	39.5	1560.25
15.	1858.6	103.1	55.6	3091.36
16.	1879.7	104.3	76.7	5882.89
17.	1886.4	104.6	83.4	6955.56

No.	x	%x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
18.	1890.2	104.8	87.2	7603.84
19.	1916.6	106.3	113.6	12904.96
20.	1936.8	107.4	133.8	17902.44
21.	1942.4	107.7	139.4	19432.36
22.	1957.0	108.5	154.0	23716.00
23.	1969.3	109.2	166.3	27655.69

$$\bar{x} = \frac{41469.2}{23} = 1803.0 \text{ U USP/mg}$$

$$s = \sqrt{\frac{352734.1}{22}} = \sqrt{16033.37} = 126.62$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{126.62}{\sqrt{23}} = \frac{126.62}{4.796} = 26.4$$

Límite de confianza de la media:

$$1803.0 \pm (2.074)(26.4)$$

$$1803.0 \pm 54.75$$

Coefficiente de variación:

$$cv = \frac{126.62}{1803.0}(100) = 7.02$$

T A B L A 8

TEMPERATURA 37° C

No.	U USP/mg	Porcentajes		
	de muestra	respecto a	la \bar{x}	
	x	% x	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
1.	2301.0	86.8	-348.0	121104.00
2.	2366.0	89.3	-283.0	80089.00
3.	2375.0	89.6	-274.0	77076.00
4.	2425.4	91.6	-223.6	49996.96
5.	2583.3	97.5	- 65.7	4316.49
6.	2593.7	97.9	- 55.3	3058.90
7.	2602.0	98.2	- 47.0	2209.00
8.	2612.0	98.6	- 37.0	1369.00
9.	2612.0	98.6	- 37.0	1369.00
10.	2702.1	102.0	53.1	2819.61
11.	2711.0	102.3	62.0	3844.00
12.	2750.0	103.8	101.0	10201.00
13.	2750.0	103.8	101.0	10201.00
14.	2750.0	103.8	101.0	10201.00
15.	2763.7	104.3	114.7	13156.09
16.	2784.6	105.1	135.6	18387.36
17.	2791.6	105.4	142.6	20334.76

No.	x	%x	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
18.	2812.5	106.2	166.5	27722.25
19.	2833.3	106.9	184.3	33966.49
20.	2860.7	107.9	211.7	44816.89

$$\bar{x} = \frac{52979.9}{20} = 2649.0 \text{ U USP/mg}$$

$$s = \sqrt{\frac{534238.8}{19}} = \sqrt{28117.83} = 167.68$$

$$\frac{s}{\bar{x}} = \frac{167.68}{\sqrt{20}} = \frac{167.68}{4.47} = 37.5$$

Límite de confianza de la media:

$$2649.0 \pm (2.093)(37.5)$$

$$2649.0 \pm 78.5$$

Coefficiente de variación:

$$cv = \frac{167.68}{2649.0} (100) = 6.33$$

T A B L A 9

Temperatura	°C	20	25	30	37
Media	\bar{x}	983.5	1317.4	1803.0	2649.0
Desviación Standard	s	46.51	77.4	126.62	167.68
Error Standard	$\frac{s}{\sqrt{x}}$	10.40	15.48	26.40	37.50
Límites de confianza de la media		983.5 ± 21.77	1317.4 ± 31.88	1803.0 ± 54.75	2649.0 ± 78.50
Coefficiente de variación	cv	4.73	5.87	7.02	6.33

RECTA DE LOS CUADRADOS MINIMOS

Para establecer una relación entre los resultados obtenidos en las determinaciones de la actividad enzimática de la tripsina por el método de la hidrólisis del éster etílico de la N-benzoil-L-arginina y poder representar gráficamente tal relación, se siguió el método de la recta de los cuadrados mínimos. Se tomo como "x" o variable independiente, a las temperaturas a las cuales fue realizado este trabajo, y como "y" o variable dependiente, a los valores de la actividad enzimática obtenidos:

x	y
Temperatura	U USP/mg
°C	
20	983.5
25	1317.4
30	1803.0

La ecuación de la recta de los cuadrados mínimos tiene la siguiente fórmula:

$$y = a_0 + a_1x$$

Los resultados estimados, utilizando esta ecuación, son los siguientes:

x	y
Temperatura	U USP/mg
°C	
19.5	917.2
20.0	958.2
20.5	999.2
21.0	1040.2
22.0	1122.1
23.0	1204.1
24.0	1286.0
24.5	1327.0
25.0	1368.0
25.5	1408.9
26.0	1450.0
27.0	1531.8
28.0	1613.8
29.0	1695.7
29.5	1736.7
30.0	1777.7
30.5	1818.7

La correlación lineal de la recta obtenida es de 0.9943, siendo satisfactoria por su cercanía a la unidad.

El método oficial en la USP XX, indica que esta valoración debe efectuarse a 25° C y se permite una variación de $\pm 0.1^{\circ}$ C en la temperatura, pero como puede observarse en la tabla anterior, una disminución o un aumento de 0.5° C a esta temperatura, ocasionará una variación en el resultado de ± 3.0 %.

A 30° C, una variación de $\pm 0.5^{\circ}$ C, significa una variación de ± 2.3 % en el resultado obtenido.

A 20° C, una variación de $\pm 0.5^{\circ}$ C, significa una variación de ± 4.4 % en el resultado obtenido.

CONCLUSIONES

1. La temperatura influye significativamente en el análisis de la tripsina por el método de la hidrólisis del clorhidrato del éster etílico de la N-benzoil-L-arginina.
2. Cuando la prueba se realiza a 25° C, de acuerdo al método de valoración descrito en este trabajo, se puede esperar una variación en el resultado de $\pm 3.0\%$ si la variación en la temperatura es de $\pm 0.5^{\circ}$ C.
3. El error absoluto debido a variaciones en la temperatura de $\pm 0.5^{\circ}$ C, es igual a 20° C, 25° C y 30° C, pero el error porcentual va disminuyendo al ir aumentando la temperatura.
4. Dados los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos, la temperatura más recomendable para efectuar la valoración de tripsina por el método aquí descrito es 20° C.
5. Desde el punto de vista biológico y farmacéutico, la valoración de la tripsina debería efectuarse a 37° C, sacrificando entonces exactitud y precisión del método.

B I B L I O G R A F I A

Enzyme Nomenclature 1978

International Union of Biochemistry. Nomenclature Commite.

Academic Press, New York, 1979

Pags. 8 - 12, 314 - 317

The Enzymes

Vol. III. Hydrolysis: Peptide Bonds.

Third Edition

Academic Press, New York - London, 1971

Pags. 249 - 275

Methods of Enzymatic Analysis

Edited by Hans - Ulrich Bergmeyer

Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr, 1963

Pags. 807 - 818

USP XX NFXV

United States Pharmacopeial Convention, inc.

Rockville, Md., 1979

Pags. 834 - 835

Methods of Enzymatic Analysis

Edited by Hans - Ulrich Borgmeyer

Second English Edition

Vol. I

Verlag Chemie - Academic Press Inc., Weinheim/Bergstr, 1974

Pags. 99 - 101, 127 - 129, 515 - 516

Bioquímica Básica

Harrow, Benjamin y Mazur, Abraham

Novena Edición

Editorial Interamericana, S. A., México, 1967

Pags. 98 - 99

Remington's Pharmaceutical Sciences

Fifteenth Edition

Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1975

Pags. 971 - 974