

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Determinación de la Acción Proteolítica de la
Pancreatina: Comparación de dos Métodos**

T E S I S
Q u e p a r a o b t e n e r
e l t í t u l o d e :
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O
p r e s e n t a :
M A . D E L O U R D E S R U I Z D E E S P A R Z A C A L D E R O N

M-172426

MEXICO, D. F.

1973



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.

A LA MEMORIA DE
MI MADRE.

CON CARÍÑO A MI
PADRE Y HERMANOS.

A MAGA.

A MIS MAESTROS

Y COMPAÑEROS

CON AGRADECIMIENTO AL

Q.F.B. IGNACIO NEGRETE R.

CON ADMIRACION AL

Q.F.B. RAMON ULACIA E.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	1
I GENERALIDADES	3
Las Enzimas	
Propiedades de la Pancreatina	
Obtención de Pancreatina	
Caseína	
Consideraciones sobre el análisis estadístico de los resultados	
Métodos de valoración	
II PLAN DE TRABAJO	24
III TRABAJO EXPERIMENTAL	30
IV RESULTADOS	36
COMENTARIOS Y OBSERVACIONES	45
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	50

Jurado Asignado Originalmente:

Presidente:	Profesor: RAMON ULACIA ESTEVE
Vocal:	Profa: ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
Secretario:	Profesor: IGNACIO NEGRETE REYNOSO
1er. Suplente:	Profesor: MARIO MIRANDA CASTRO
2o. Suplente:	Profesor: ALFREDO GARZON SERRA

Sitio donde se desarrolló el Tema: Laboratorios Carnot.

Sustentante:	Ma. DE LOURDES RUIZ DE ESPARZA CALDERON
Asesor del tema:	IGNACIO NEGRETE REYNOSO

A LOS LABORATORIOS CARNOT,
AL SR. PAUL ANTEBI Y
AL SR. QUIM. JORGE GAY M.,
POR HABERME BRINDADO SU VALIOSA
AYUDA PARA LA REALIZACION
DEL PRESENTE TRABAJO

Tanto en el campo de la Farmacia, como en los de la Medicina y la Biología, se encuentran infinidad de sustancias químicas de las cuales es necesario conocer su concentración efectiva o su actividad, las enzimas, no escapan a esa necesidad.

La vida depende de un trabajo muy complejo de reacciones, muchas de las cuales son llevadas a cabo por enzimas específicas y cualquier alteración de esas reacciones pueden ocasionar trastornos en el organismo.

Por lo que respecta al organismo humano, las enzimas pueden ser suministradas, ya sea para ayudar al buen funcionamiento y en otros casos, para sustituir la ausencia de las mismas. Para ambos casos, es condición indispensable, determinar la actividad de las enzimas que se usarán con fines terapéuticos.

Para ese objeto, pueden seguirse dos diferentes caminos, mediante la reproducción de las constantes fisiológicas del organismo o bien se busca un sistema en el cual la enzima pueda tener una actividad máxima, a condición de que esa actividad sea constante en las mismas condiciones.

El presente trabajo esta dirigido al estudio de la variación de la actividad proteolítica de la pancreatina, usando para ello dos métodos: el primero considerado como oficial y el segundo basado en los mismos principios que el anterior, solo cambiando el diseño del mismo.

Ambos métodos se comparan analizando en forma estadística los datos obtenidos en cada caso, lo cual requiere que los datos numéricos se presenten en forma organizada, - una vez clasificados y agrupados convenientemente, presentar los en forma adecuada, ya sea numérica o gráficamente y por último, lograr su interpretación.

Sin embargo es posible comparar los dos métodos, - determinando cuál de ellos tiene menor variación y por tanto mayor reproducibilidad, y por lo tanto cuál de los dos métodos es el más recomendable.

I GENERALIDADES

ENZIMAS

Las enzimas son sustancias de tipo proteico, que se encuentran en todos los organismos vivos y que funcionan como catalizadores biológicos (1), es decir son capaces de incrementar la velocidad de reacción sin que el proceso se altere, teniendo éste una especificidad muy marcada, con lo cual en dichos procesos se logran cambios químicos rápidos, aún a bajas temperaturas (2).

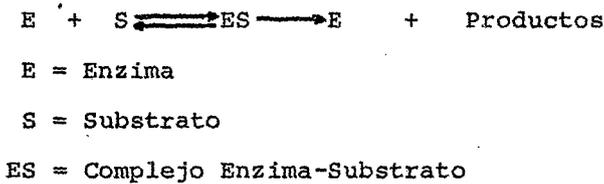
Las enzimas como catalizadores, no participan permanentemente en el cambio químico que ellas promueven; una vez que se efectuó el cambio, la enzima se libera intacta.

Por su naturaleza proteica, las enzimas presentan los atributos de las proteínas: desnaturalización, precipitación por sales y disolventes, pueden ser destruidas por la acción de temperaturas elevadas y son sensibles a los cambios de pH.

MECANISMO DE ACCION ENZIMATICA.-

Las enzimas como todo catalizador, son capaces de disminuir la energía de activación requerida para la reacción, interviniendo en las moléculas que reaccionan para formar el complejo activado, el cual es transitorio, llamado enzima-substrato, en un momento dado dicha reacción puede ser rever

sible, y da lugar a productos de reacción. La enzima al quedar libre no se ha alterado y puede recombinarse con más cantidad de sustrato, el proceso puede repetirse tantas veces como sustrato contenga (3).



A diferencia de los catalizadores inorgánicos (4), las enzimas tienen una gran especificidad, tanto por lo que respecta al sustrato sobre el cual actúa, como al tipo de reacción que cataliza (5), debido a que tienen en su superficie un sitio activo (2), en el cual puede acomodarse en el sustrato específico únicamente y por lo tanto, solo se combina con un tipo particular de sustrato.

Algunas enzimas, contienen además de una porción proteica llamada apoenzima, un componente orgánico no proteico de peso molecular pequeño llamado cofactor o coenzima, el cual es de vital importancia para la activación de la enzima, asimismo un número apreciable de enzimas tienen en su composición un ión metálico llamadas entonces metaloenzimas y otras contienen tanto la apoenzima como el componente o activador.

se sintetizan en esta
proenzimas o zimógenos -
den en enzimas activas, me
as o menos específicos, de tal
do ina enzima activa se ha formado, puede
(5). de su propio zimógeno, desarrollan-
diación autocatalítica. En general la-
SROS se observan entre las enzimas digesti

FACTORES FISICOS QUE MÓDIFICAN LA VELOCIDAD DE
LAS REACCIONES ENZIMATICAS

TEMPERATURA:

La velocidad de reacción de casi todas las reacciones químicas sean o no catalizadas, aumenta al aumentar la temperatura; en las reacciones catalizadas por enzimas-también siguen esta misma regla, (ver gráfica pag. 7) sin-embargo como son sustancias de tipo proteico deben tomarse en consideración los siguientes factores:

- a.- Una temperatura óptima donde la velocidad - enzimática sea mayor.
- b.- Con temperaturas mayores o menores a la óptima la velocidad de reacción será más lenta.
- c.- Por lo general una enzima al someterse a temperaturas mayores de 40°C , pierde sus características, hasta llegar a desnaturalizarse.

pH:

La actividad de una enzima está relacionada con el pH teniendo ésta una actividad catalítica mayor a un pH determinado: pH óptimo (ver gráfica pag. 7). Si se aumenta o disminuye se afecta su estado iónico y se puede llegar a la desnaturalización de la enzima a pH's extremadamente altos o bajos.

CONCENTRACION DE LA ENZIMA:

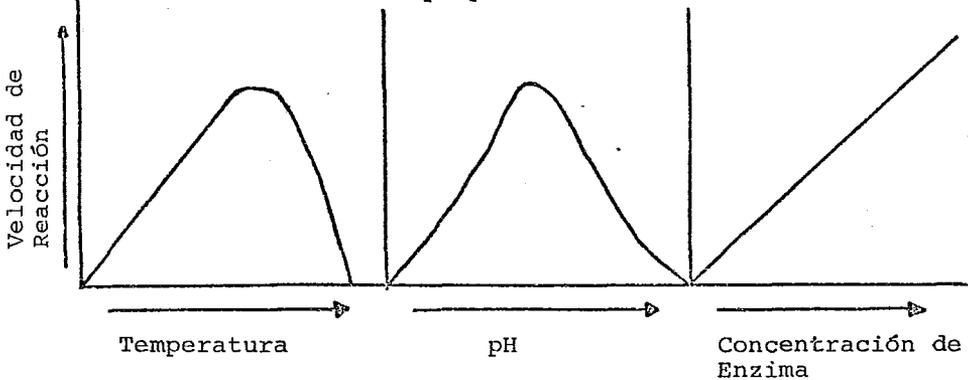
La velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima es directamente proporcional a la concentración de la enzima. (ver gráfica siguiente).

$$\text{velocidad} = - \frac{dS}{dt} = k \cdot E \cdot S$$

S = Concentración de sustrato que en este caso se mantiene constante

E = Enzima

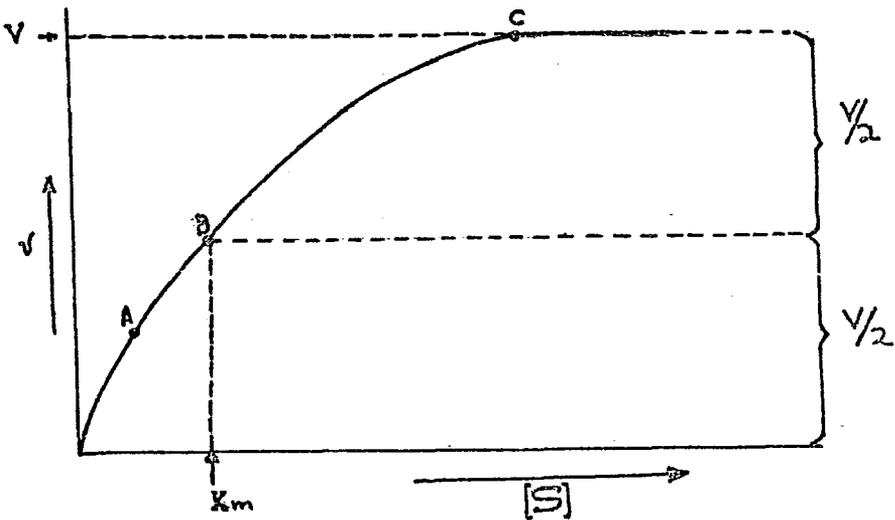
K = Constante de proporcionalidad



CONCENTRACION DE SUBSTRATO

Si se incrementa la concentración de sustrato y se mantienen constantes las demás condiciones (concentración de enzima, pH y temperatura), se alcanza la velocidad máxima de reacción de la enzima, siempre y cuando haya enzima libre capaz de reaccionar.

Cuando la mitad exactamente de moléculas de enzima han reaccionado con el sustrato, la velocidad es entonces - la mitad de la velocidad máxima que se puede alcanzar a ésta concentración de enzima en particular (6), la concentración de sustrato a la cual se produce la mitad de la velocidad - máxima, se le llama Constante de Michaelis (K_m). Como se -- muestra en la siguiente gráfica:



En los puntos A y B, menos de la cantidad total de la enzima, está combinada con el sustrato. En C esencialmente toda la enzima está combinada con el sustrato, y aún aumentando la concentración de sustrato no puede causar incremento en la velocidad de reacción, puesto que no existe enzima libre disponible para reaccionar.

PROPIEDADES DE LA PANCREATINA

La pancreatina es una substancia que contienen amilasa, proteasas y lipasas, las cuales son enzimas proteolíticas.

Las enzimas proteolíticas en el tracto digestivo (6), que intervienen en la digestión, son producidas y secretadas como precursores inactivos, llamados apoenzimas o zimógenos (7), encontrándose en proporciones diferentes en el humano (8,9). Las reacciones se catalizan a temperaturas normales del cuerpo y a pH entre 2 y 9, las enzimas proteolíticas se inactivan cuando rebasan estos límites.

La activación de las enzimas proteolíticas puede llevarse a cabo mediante la enteroquinasa, que es una enzima intestinal; aunque puede haber una activación autocatalítica cuando se trata de tripsinógeno y quimitripsinógeno (zimógenos de la tripsina y quimotripsina respectivamente), en presencia de una pequeña cantidad de tripsina que se encuentra ya activada, la cual es capaz de activar al tripsinógeno o al quimitripsinógeno (10).

SISTEMA PRECURSOR

Tripsinógeno	-----pH neutro----- tripsina	Tripsina
Quimotripsinógeno	----- tripsina	Quimotripsina

Las enzimas proteolíticas se clasifican en dos -
grupos:

- a).- Las Endopeptidasas - Hidrolizan las uniones
peptídicas internas
- b).- Las Exopeptidasas -- Hidrolizan las uniones
peptídicas externas

Se ha encontrado que las endopeptidasas, actúan-
mejor en la unión peptídica, derivada del grupo amino, de
un ácido aromático como la L-tirosina y la L-fenil-alanina.
Como se ve en la tabla la tripsina y la quimotripsina corres-
ponden a éste grupo.

La quimotripsina rompe el grupo carbonilo de los
ácidos aromáticos. La tripsina hidroliza preferentemente -
las uniones peptídicas constituídas de lisina o arginina, --
obteniéndose por lo tanto carboxilos libres de estos amino -
ácidos.

CLASIFICACION Y PROPIEDADES GENERALES DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

FUENTE	ENZIMA	TIPO	pH OPTIMO	SISTEMA PRECURSOR	ESPECIFICIDAD
Pancreatina	Tripsina	Endopeptidasa	7	Tripsinógeno $\xrightarrow{\text{neutro}}$ Tripsina tripsina	$ \begin{array}{c} \text{-NH-CH-CO-NH-} \\ \\ \text{R} \\ \\ \text{-CO-OC}_2\text{H}_5 \end{array} $
	Quimotripsina	Endopeptidasa	8	Quimotripsinógeno $\xrightarrow{\text{neutro}}$ Quimotripsina tripsina	$ \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{-NH-CH-CO-NH-} \\ \\ \text{-CO-OC}_2\text{H}_5 \end{array} $

R = Lisina ó Arginina

R = Aromático

PROTEASAS EN PANCREATINA

Las proteasas más importantes de la pancreatina son la tripsina y la quimitripsina, las cuales como se dijo anteriormente se encuentran en forma de zimógenos inactivos.

TRIPSINA.

Fué obtenida en forma cristalina por Kanitz y Northor (12), teniendo un peso molecular cercano a 24,000 y un punto isoeléctrico a un pH de 10.5 (13,14). El ataque enzimático se lleva a cabo sobre proteínas como la caseína o hemoglobina a un pH óptimo cercano a 8. La tripsina es una endopeptidasa, la cual actúa sobre las uniones CO-NH de substratos sintéticos de estructura simple.

La especificidad de la tripsina (15) se dirige a la hidrólisis de las uniones peptídicas, en la cual contribuyen los residuos de L-arginina o de L-lisina (16,17).

La tripsina deriva de su precursor inactivo llamado tripsinógeno (12), la activación puede llevarse a cabo mediante la presencia de otra enzima llamada enteroquinasa, o puede ser autocatalítica, cuando una pequeña porción de tripsina ya activada transforma el tripsinógeno a tripsina.

Durante el proceso de activación se forma una proteína inerte, la cual se sedimenta lentamente, que puede ser considerada como un polímero de la enzima monomérica (18). - La formación de la proteína inerte, puede ser inhibida con la adición de iones calcio (19,20), los cuales promueven la conversión de tripsinógeno a tripsina y la estabilidad de la misma se ve incrementada (21,22).

La tripsina puede actuar los ésteres y amidas de la lisina o arginina (23, 24, 25) así como con substratos como la caseína y hemoglobina (16).

Durante la hidrólisis de la caseína por tripsina, los productos solubles en ácido tricloroacético son formados, como el contenido de tirosina y triptofano, los cuales son determinados por la absorción a 280 m μ .

QUIMOTRIPSINA.-

Otra sustancia que contiene la secreción pancreática es la quimotripsina, la cual está constituida por un gran número de proteínas enzimáticas: (α , β , γ , δ - quimotripsinas), - teniendo todas actividad proteolítica, derivando todas ellas de un precursor inactivo llamado quimotripsinógeno. (12).

La quimotripsina tiene un peso molecular cercano a 25,000 y un punto isoeléctrico cercano a 9.5. El tripsinógeno

está formado por 25,000 unidades de un grupo alfa-amino libre, el cual contiene un residuo de cisteína, el grupo amino de éste residuo unido a una cadena peptídica (27), contiene también un residuo tirosina terminal.

La adición de cantidades catalíticas de tripsina a las soluciones de quimotripsinógeno, causa la actividad -- del mismo, dando lugar a la formación también de las diferentes quimotripsinas (20).

Las proteínas que son capaz de hidrolizar la quimotripsina con la caseína y la hemoglobina (29) y substancias sintéticas como N-benzil - L-fenil alanina.

La caseína es hidrolizada por la quimotripsina con la formación de productos de hidrólisis como la tirosina y - el triptófano, su contenido de ambos puede medir espectrofotométricamente después de la precipitación del substrato residual a 280 mn.

OBTENCION DE PANCREATINA

Existen varios métodos para la obtención de pancreatina, todos basados fundamentalmente en la extracción de la enzima a partir del páncreas con solventes orgánicos o mezclas de estos.

El páncreas finamente picado (35), se mezcla con agua fría, equivalente a la mitad de su peso, se amasa, se agita, se exprime y se filtra. Al filtrado se le agrega un volumen igual de alcohol, efectuada ésta operación el precipitado se recoge y se lleva a sequedad a temperatura de 40° C, teniendo como resultado un polvo de tipo Harinoso.

Existen otros métodos para la extracción de pancreatina a partir del páncreas picado, con una mezcla de cloroformo-agua, en donde posteriormente se filtra y se evapora a sequedad a presión reducida (36). También se puede dejar la glándula picada con cuatro veces su peso de alcohol al 25% durante cuatro días, permaneciendo en reposo, la extracción de ésta forma dará como resultado pancreatina rica en enzimas proteolíticas.

Bauer y Vazakas (37), recomienda que se tenga el páncreas picado, primero en acetona, luego en una mezcla de éter-acetona y posteriormente éter solo, se mezcla y se pulveriza. La pancreatina obtenida contiene la actividad enzimática dos o tres veces superior a las muestras ordinarias comerciales.

E. Lenin (38), patentó un método basado en el secado por destilación azeotrópica bajo condiciones de presión reducida. Sin embargo la obtención de enzimas concentradas ha sido patentada por N.H. Phillip (39) en Holanda; Wilson y Co. (40) en E.E.U.U. y Ornoterapia (41) en Milán.

CASEINA

La caseína es la proteína principal de la leche de vaca, es una fosfoproteína constituida por cerca de 15 aminoácidos.

La caseína (23), está constituida por cuatro fracciones (α_s , $1,2$; α_s , β , γ), la fracción α - caseína contiene varias proteínas, algunas de ellas solubles en presencia de iones calcio; conteniendo diferentes cantidades de glicopéptidos. Cada una de las fracciones tiene pesos moleculares diferentes, así como la solubilidad varia entre cada una de ellas, por lo cual para obtener una solución clara de caseína deberá ser previamente calentada en baño de agua.

La caseína tiene grupos fosfato (31), los cuales se esterilizan con los residuos hidroxilos de los ácidos hidroxilamino, tiene alto contenido de serina a la cual se encuentran unidos los grupos fosfato (32), también se encuentran unidos a treonina (33). La caseína como sustrato no requiere de un proceso especial de desnaturalización sigue las mismas condiciones de las proteínas.

CONSIDERACIONES SOBRE EL
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para poder determinar la eficacia de un método determinado, es necesario hacer uso de la estadística, y así - conocer el tipo de error - si lo hay - en la experiencia, generalmente es necesario que se repita varias veces la operación de dicho método, para estudiar la variabilidad de los resultados obtenidos en cada caso y conocer la reproducibilidad del mismo.

Dosis (2+2) (49)

En este caso se hace el análisis estadístico, obteniendo resultados para las diferencias entre patrón y problema, así como de los resultados de las diferencias entre los grupos de valores experimentales.

Entonces se analizan las desviaciones de regresión, en la desviación del paralelismo, entre grupos y por último - entre patrón y problema, obteniéndose las varianzas prácticas, que a su vez se comparan con las varianzas teóricas para obtener el tipo de significación.

En los resultados del análisis estadístico, en las columnas de las varianzas, se observa:

a.- La columna P 5%, que representa la relación de las varianzas teóricas para un 5% de influencia al azar y los

grados de libertad correspondientes, los cuales se toman de las tablas Fischer (42).

b.- Una columna F que relaciona las varianzas experimentales (cuadrados medios) de cada concepto con el cuadrado medio del error.

Comparando estas columnas, por identificación se establece que cuando $F > P$ las diferencias entre los conceptos referidos a la naturaleza de la variación son significativas.

Por lo cual se deduce:

Para cada serie de valores: (cada serie esta constituida por 12 determinaciones diferentes, las cuales están formadas por dos dosis de patrón y dos dosis de problema, - siendo una dosis mayor y una menor.)

I.-

- a). Si se tiene en la variación entre grupos que $F < P$ los grupos NO difieren significativamente entre sí. Es decir no ha habido gran variación entre los resultados de las diferentes determinaciones e indica por lo tanto que no ha habido cambio de sensibilidad en la preparación a lo largo del ensayo.

- b). Pero si $F > P$ los grupos difieren significativamente entre sí, lo que indica que aún teniendo la misma concentración en las determinaciones diferentes, hubo una gran variación entre los resultados obtenidos.

II.-

- a). En la variación entre patrón y problema cuando $F > P$, la diferencia es significativa, indica que las dos soluciones ensayadas (patrón y problema), difieren en actividad cuantitativamente.
- b). Cuando $F < P$ en la variación entre patrón y problema, la diferencia no es significativa, e indica que las dos soluciones ensayadas no difieren entre sí.

III.-

La línea de regresión es significativa cuando $F > P$, lo cual está relacionado con la eficacia del método.

IV.-

Por último, por ser $F < P$ para la desviación del paralelismo, se concluye que las líneas -

dosis-respuesta experimentales se consideran prácticamente paralelas, ya que la desviación de su paralelismo NO es significativo, por lo cual no hay diferencias cualitativas en el comportamiento de las dosis ensayadas.

Posteriormente se determina el intervalo de confianza, pudiendo fijar los límites de error a un nivel de probabilidad del 95% buscando el valor de t en las tablas de Fischer, con respecto a los grados de libertad.

METODOS DE VALORACION

En la literatura se encuentran diversos métodos - para valorar la actividad proteolítica de la Pancreatina. Sin embargo en todos ellos se usa como substrato caseína en agua, la enzima debe estar solubilizada en agua o en algún amortiguador, actuando sobre el substrato en un intervalo - de tiempo de 30 a 60 minutos, a una temperatura óptima de - hidrólisis, con límites de temperaturas de 35° a 40° C. En todos los casos la reacción se suspende con una solución - acética.

Los métodos más usados para la valoración de pancreatina, consiste fundamentalmente en agregar a una solución de caseína una cantidad determinada de pancreatina, mezcla - que se calentará a baño de agua a 40° C durante 60 minutos y - una vez que se suspende la reacción con solución acética, tiene la propiedad de no presentar precipitado, debido a que la enzima es capaz de hidrolizar la cantidad presente de substrato. (43, 44, 45, 46).

El método basado en la titulación volumétrica (36), es aquel donde la digestión de la caseína por la pancreatina, es valorada en virtud de la titulación. Por esta digestión - la caseína es hidrolizada en amino ácidos, los cuales no se - pueden titular directamente con álcalis por su naturaleza --

anfotérica, motivo por el cual se le agrega formaldehido para convertir los grupos amino en derivados metilen-imino y posteriormente los grupos carbonilos libres de los aminoácidos, se titulan con hidróxido de sodio.

Por último el poder digestivo de la pancreatina - se puede medir espectrofotométricamente (35). haciendo una mezcla con una solución de caseína y haciendo actuar sobre esta una solución de pancreatina; teniendo tres concentraciones diferentes de pancreatina patrón y una sola para el problema. Dejándolas actuar por un tiempo de 60 minutos a una temperatura de 40°C , posteriormente se filtran, obteniéndose del filtrado aminoácidos como la tirosina y triptofano provenientes de la caseína, que pueden medirse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 m μ .

II PLAN DE TRABAJO

En el presente trabajo se emplearán dos métodos:

I.- Para el método (A).

- a). Se harán cuatro series de concentraciones diferentes, teniendo en cada serie una - concentración mayor y otra menor, tanto - para el patrón como para el problema.

Serie I: 20 y 40 mcg/ml.

Serie II: 30 y 60 mcg/ml.

Serie III: 40 y 80 mcg/ml.

Serie IV: 60 y 120 mcg/ml.

Para cada una de las series se harán 12 - determinaciones diferentes.

- b). Se hará un análisis estadístico de los resultados, aplicando las fórmulas estadísticas normales, utilizadas en las pruebas -- biológicas relacionadas a la Dosis-Respuesta, para el método de la Dosis (2+2), de la -- siguiente forma:

1. Se analizan estadísticamente por separado cada una de las series de valores, tomando en conjunto las doce determinaciones de cada serie.

2. Posteriormente se hace el análisis estadístico, también de cada una de las cuatro series de valores, pero agrupando las doce determinaciones de cada serie en cuatro grupos diferentes, cada grupo consta de tres determinaciones, las cuales fueron trabajadas el mismo día, con su patrón respectivo, obteniéndose de esta forma cuatro resultados más de cada serie de concentraciones.
- c) Una vez obtenidos los valores anteriores se determinará:
1. La actividad enzimática de cada serie
 2. El error del método considerando todos los valores de cada serie
 3. En cada serie el grado de correspondencia de la varianza por:
 - i. Diferencia entre grupos
 - ii. Diferencias entre patrón y problema.
 - iii. Regresión
 - iv. Desviación del paralelismo
- d). Determinar los límites fiduciales de cada

serie y para los diferentes grupos de ca
da serie.

- e). Fijar los límites fiduciales para una de
terminación (serie) y tres determinacio-
nes (grupos).

II. Para el Método (B).

- a). Consiste en la comparación del problema -
con una curva estandar, en la cual se lee
la concentración de la pancreatina problema
ma, teniendo tres concentraciones diferentes
tes para el patrón (30, 60 y 90 mcg/ml) y
la concentración de la pancreatina problema
ma aproximadamente de 60 mcg/ml. Se ten--
drán seis curvas estandar.
- b). Calcular la regresión para cada una de -
las seis curvas estandar.
- c). Analizar la desviación del paralelismo de
las curvas estandar
- d). Obtener la curva "promedio" de las seis -
curvas anteriores.

III. De los dos métodos:

Del método A.- Con los datos obtenidos de la-
actividad enzimática decidir cuales son las -

concentraciones óptimas para la lectura de la potencia.

Comparar los límites fiduciales obtenidos de los cuatro grupos de tres determinaciones de cada serie.

Del método B. Comparar los datos obtenidos del problema de su correspondiente estandar, con la curva estandar promedio.

Finalmente hacer la comparación de los resultados del análisis estadístico para los dos métodos usados.

DESARROLLO

Para el desarrollo del presente trabajo es necesario fijar las siguientes condiciones:

Temperatura:

Método A.- $35^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Método B.- $40^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

pH:

Métodos A y B: 7-8

Tiempo de hidrólisis:

Método A.- 30 minutos

Método B.- 60 minutos

REACTIVOS:

Métodos A y B.- Pancreatina de Referencia N.F.

Métodos A y B.- Substrato de caseína (1.25%)

pH=8

Solución amortiguadora;

Método A.- Solución amortiguadora de boratos

Método B.- Solución amortiguadora de fosfatos

Solución de ácido tricloropacético:

Método A y B al 50%

Solución de cloruro de calcio:

Método A.- 0.02M

APARATOS:

Baño de agua ajustado a:

Método A.- $35^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Método B.- $40^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Tubos de ensaye: Pipetas volumétricas, Matraces -
aforados, Mortero de ágata, Espectrototómetro --
Beckman D.U, Termómetro de 100°C , Cronómetro, Agi-
tador magnético, Papel filtro.

III TRABAJO EXPERIMENTAL

METODO A (48)

a).- Solución patrón: Se pesan 25 mg. de Pancreatina patrón, se tritura con un mortero de ágata, con unas - gotas de CaCl_2 , se pone en un matraz volumétrico de 25 ml y se afora con solución de cloruro de calcio.

b).- Solución problema: Se pesan 25 mg. de Pancreatina problema, posteriormente se sigue el mismo procedimiento que en la solución patrón.

Se toman alicuotas de las soluciones a) y b), para obtener cuatro conjuntos de concentraciones diferentes, para cuatro series diferentes en la siguiente forma:

1.- Para la primera serie tomar una concentración menor de 20 mcg/ml y una concentración mayor de 40 mcg/ml, - tanto de la solución patrón como del problema.

2.- Para las series 2, 3 y 4 se toman 30 y 60; 40 y 80; y 60 y 120 mcg/ml respectivamente.

Tomada la alicuota correspondiente se deposita en un matraz, se afora a 100 con solución amortiguadora pH 7.5.

Para llevar a cabo el método se usan los reactivos de la siguiente forma, usando dos series de tubos, una de -- las cuales sirven de blancos y otros como tubos de prueba.

BLANCOS

<u>Tubos</u>	<u>Solución Amortiguadora</u>	<u>Solución Patrón</u>	<u>Solución Problema</u>	<u>Caseína</u>	<u>Acido Tricloroacético,</u>
S ₂ bl	1 ml.	2 ml. (conc. menor)	----- 2 ml. (conc. menor)	2 ml.	5 ml. +
P ₂ bl	1 ml.	-----	(conc. menor)	2 ml.	5 ml. +
S ₁ bl	1 ml.	2 ml. (conc. mayor)	-----	2 ml.	5 ml. +
P ₁ bl	1 ml.	-----	2 ml. (conc. mayor)	2 ml.	5 ml. +

+ Calentar a 35°C durante 30 minutos.

PRUEBA

S ₂	1 ml	2 ml. (conc. menor)	-----	2 ml. +	5 ml.
P ₂	1 ml.	-----	2 ml. (conc. menor)	2 ml. +	5 ml.
S ₁	1 ml.	2 ml. (conc. mayor)	-----	2 ml. +	5 ml.
P ₁	1 ml.	-----	2 ml. (conc. mayor)	2 ml. +	5 ml.

+ Calentar a 35°C durante 30 minutos.

Se tiene un solo tubo de blanco para calibrar el espectrofotómetro; conteniendo solución pH 7.5, 3 ml; ácido tricloroacético 5 ml. y caseína 2 ml.

Posteriormente se dejan los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos y se filtra, se leen las absorbancias a 280 mμ de cada una de las diferentes concentraciones de patrón y problema de los tubos de blanco y de prueba correspondientes.

Una vez hecho ésto se obtiene el valor real para el estandar y el problema restándoles a los valores de los tubos de prueba los valores de el tubo de blanco correspondiente.

METODO B (35)

Se tiene una solución patrón con 100 mg. de Pancreatina, se tritura en un mortero con solución amortiguadora, luego se lleva a 100 ml. con la misma solución, se toma una alícuota de 5 ml. a un matraz de 50 ml. y se afora con solución amortiguadora.

Se hace una solución de ensayo con la Pancreatina-problema en la misma forma que la solución patrón.

Se usan tubos marcados en la siguiente forma: marcando S a los tubos correspondientes a la pancreatina patrón y U a los del problema. Se tiene un tubo de blanco para calibrar el espectrofotómetro, conteniendo todos los reactivos - excepto la enzima (pancreatina).

Es necesario tener concentraciones diferentes de la Pancreatina patrón de 30, 60 y 90 mcg/ml, la concentración de Pancreatina en estudio es de 60 mcg/ml. aproximadamente.

BLANCOS

<u>Tubos</u>	<u>Solución Amortiguadora</u>	<u>Solución Patrón</u>	<u>Solución Problema</u>	<u>Caseína</u>	<u>Acido Tri-cloroacético</u>
S ₁ bl	2 ml.	1 ml.	----	2 ml.	5 ml. +
S ₂ bl	1 ml.	2 ml.	----	2 ml.	5 ml. +
S ₃ bl	----	3 ml.	----	2 ml.	5 ml. +
U bl	2 ml.	----	2 ml.	2 ml.	5 ml. +

+ Calentar 40°C durante 60 minutos

PRUEBA

S ₁	2 ml.	1 ml.	----	2 ml. +	5 ml.
S ₂	1 ml.	2 ml.	----	2 ml. +	5 ml.
S ₃	----	3 ml.	----	2 ml. +	5 ml.
U	2 ml.	----	2 ml.	2 ml. +	5 ml.

+ Calentar 40 °C durante 60 minutos

Una vez efectuada la hidrólisis, se dejan los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se filtran, se leen las absorbancias de las concentraciones diferentes del patrón y la única del problema, tanto de los tubos blancos como de los tubos de prueba, lo cual se hace a 280 m μ .

De los valores obtenidos de las absorbancias de los tubos de prueba, se restan los valores obtenidos de los tubos de blancos. Teniendo ya los valores reales de el patrón y problema se procede a graficar los valores del patrón, (densidad óptica contra concentración) y posteriormente las absorbancias obtenidas del patrón se leen en la curva para obtener la concentración de la misma.

IV.- RESULTADOS

TABLA No. 1

Método (A)

Concentraciones	Dosis	Prom.
20y40 mcg/ml.	S ₁	0.1801
	S ₂	0.8002
	P ₁	0.1810
	P ₂	0.083
30 y 60 mcg/ml	S ₁	0.321
	S ₂	0.157
	P ₁	0.307
	P ₂	0.142
40 y 80 mcg/ml	S ₁	0.394
	S ₂	0.182
	P ₁	0.388
	P ₂	0.177
60 y 120 mcg/ml	S ₁	0.647
	S ₂	0.320
	P ₁	0.605
	P ₂	0.327

Valores obtenidos de un promedio de 12 determinaciones para cada dosis.

T A B L A N O . 2

SERIE I 20 y 40 mcg/ml					
Naturaleza de la Variación	Suma de cuadrados $\times 10^{-4}$	G.L.	Cuadrado medio $\times 10^{-4}$	Varianzas	
				F	P
Entre Grupos	453.1	10	45.31	25.29	> 2.14
Entre Patrón y Problema	0.8802	1	0.8802	2.03	< 250.0
Regresión	1070.6	1	1070.6	597.6	> 4.15
Paralelismo	0.3502	1	0.3502	-0.195	< 250.0
Error	59.11	33	1.791		
Total	1584.04	46			

MEDIA M =	8.203×10^{-3}
ACTIVIDAD (R) =	101.9%
LIMITE FIDUCIAL	A = 96.18%
	± 0.0251
	B = 107.9%

SERIE II 30 y 60mcg/ml.					
Naturaleza de la Variación	Suma de cuadrados $\times 10^{-4}$	G.L.	Cuadrado medio $\times 10^{-4}$	Varianzas	
				F	P
Entre Grupos	38.0	10	3.80	1.39	< 2.14
Entre Patrón y Problema	28.06	1	28.06	10.26	> 4.15
Regresión	3240.6	1	3240.6	1158.7	> 4.15
Paralelismo	0.0208	1	0.0208	131.3	< 250.0
Error	90.2	33	2.73		
Total	3396.9	46			

MEDIA M =	-2.78×10^{-2}
ACTIVIDAD (R) =	93.76%
LIMITE FIDUCIAL	A = 95.4%
	± 0.018
	B = 103.7%

SERIE III 40 y 80 mcg/ml					
Naturaleza de la Variación	Suma de cuadrados $\times 10^{-4}$	G.L.	Cuadrado medio $\times 10^{-4}$	Varianzas	
				F	P
Entre Grupos	560.2	10	56.02	4.36	> 2.14
Entre Patrón y Problema	3.685	1	3.685	3.48	< 250.0
Regresión	5357.0	1	5357.0	417.75	> 4.15
Paralelismo	0.0252	1	0.0252	1.9×10^{-2}	< 250.0
Error	423.2	33	12.82		
Total	6344.4	46			

MEDIA M =	-7.904×10^{-3}
ACTIVIDAD (R) =	98.17%
LIMITE FIDUCIAL	A = 91.54%
	± 0.0304
	B = 105.3%

SERIE IV 60 y 120 mcg/ml					
Naturaleza de la Variación	Suma de cuadrados $\times 10^{-4}$	G.L.	Cuadrado medio $\times 10^{-4}$	Varianzas	
				F	P
Entre Grupos	154.0	10	15.40	2.43	< 2.70
Entre Patrón y Problema	35.58	1	35.58	1.045	< 250.0
Regresión	1094.7	1	1094.7	291.8	> 4.15
Paralelismo	73.26	1	73.26	1.95	< 4.15
Error	1238.0	33	37.51		
Total	12448.0	46			

MEDIA M =	-3.4×10^{-2}
ACTIVIDAD (R) =	92.26%
LIMITE FIDUCIAL	A = 85.0%
	± 0.0367
	B = 100.5%

TABLA No 3

SERIE I 20 y 40 mcg/ml.

Naturaleza de la Variación.	Suma de Cuadrados				G.L. Gpo. 1,2,3,4	Cuadrado Medio				Varianzas							
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$		$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	F	P	F	P	F	P	F	P
Entre Grupos	1572.4	231.0	756.0	400.0	2	708.6	111.5	378.0	200.0	77.02	5.14	8.07	5.14	24.1	5.14	28.37	5.14
Entre Patrón y Problema	13.33	3.67	1.408	1.40	1	13.33	36.75	1.408	1.40	1.44	5.99	2.56	5.99	11.17	234	2.4	5.99
Regresión	2702.0	3213.6	2349.0	2511.0	1	2702.0	3213.6	2349.0	2511.0	293.5	5.99	224.7	5.99	150	5.99	732.1	5.99
Paralelismo	5.63	0.208	27.07	0.675	1	5.633	0.208	27.07	0.675	1.63	234	0.014	234	1.72	5.99	5.08	234
Error	55.2	86.0	94.0	20.6	6	9.2	14.33	15.66	3.43								
TOTAL	4348.6	3533.0	3227.0	2573.7	11												

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
MEDIA \bar{M}	20.43×10^{-3}	9.73×10^{-3}	-22.4×10^{-3}	8.2×10^{-3}
ACTIVIDAD (R)	104.7%	102.3%	94.5%	101.9%
LIMITES FIDUCIALES	± 0.043 A- 94.9% B- 115.6%	± 0.049 A- 91.2% B- 114.3%	± 0.060 A- 82.8% B- 109.1%	± 0.027 A- 95.7% B- 108.4%

SERIE II 30 y 60 mcg/ml.

Naturaleza de la Variación	Suma de Cuadrados				G.L. Gpo. 1,2,3,4	Cuadrado Medio				Varianzas							
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$		$\times 10^{-5}$	F	P	F	P	F	P	F				
Entre Grupos	11.0	22.0	9.0	1.7	2	5.5	11.0	4.5	0.85	1.13	5.14	1.51	5.14	15.8	19.3	1.39	19.3
Entre Patrón y Problema	218.7	13.33	8.53	140.8	1	218.7	13.33	8.53	140.8	45.2	5.99	1.83	5.99	8.38	234	11.9	5.99
Regresión	10716.3	7712.0	8100.0	6192.0	1	10716.3	7712.0	8100.0	6192.0	2217.3	5.99	1058.9	5.99	113.2	5.99	523.2	5.99
Paralelismo	10.8	10.8	26.13	17.63	1	10.8	10.8	26.13	17.63	2.23	5.99	1.48	5.99	2.73	234	1.49	5.99
Error	29.0	43.7	429.2	71.0	6	4.83	7.28	71.53	11.83								
TOTAL	10985.7	7801.8	8572.8	6423.0	11												

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
MEDIA \bar{M}	42.99×10^{-3}	-12.58×10^{-3}	-9.79×10^{-3}	-46.17×10^{-3}
ACTIVIDAD (R)	110.4%	97.16%	99.82%	89.91%
LIMITES FIDUCIALES	± 0.0193 A- 105.4% B- 115.3%	± 0.022 A- 92.04% B- 102.3%	± 0.0673 A- 84% B- 114%	± 0.0326 A- 96.8% B- 83.4%

* Valores obtenidos de un promedio de 3 determinaciones.

TABLA No. 4

SERIE III 40 y 80 mcg/ml																	
Naturaleza de la Variación	Suma de Cuadrados				G.L.	Cuadrado Medio				Varianzas							
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$		$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-5}$	F	P	F	P	F	P	F	P
Entre Grupos	406.0	109.0	201.2	405.7	2	203.0	54.52	100.6	202.8	1.31	5.14	2.11	5.14	3.74	5.14	1.43	5.14
Entre Patrón y Problema	4.03	4.8	97.2	6.07	1	4.03	4.8	97.2	6.07	38.4	234	5.38	234	365	5.99	23.2	234
Regresión	1536.8	14126.0	14170.1	10212.0	1	15368.1	14126.0	14151.0	16212.0	99.2	5.99	546.8	5.99	226.5	5.99	72.3	5.19
Paralelismo	5.633	34.13	7.5	21.6	1	5.63	34.13	7.50	21.67	27.4	234	1.32	5.99	3.58	234	6.50	234
Error	929.3	155.0	161.5	846.6	6	154.8	25.83	26.92	141.1								
Total	16705.2	14428	14637.6	11492.1	11												

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
MEDIA \bar{M}	-4.927×10^{-3}	-6.935×10^{-3}	-24.93×10^{-3}	7.34×10^{-3}
ACTIVIDAD (R)	98.86%	98.4%	94.41%	101.7%
LIMITES FIDUCIALES		A= 91.6% ± 0.031 B= 105.7%	A= 87.5% ± 0.032 B= 101.6%	A= 83.2% ± 0.0867 B= 124.2%

SERIE IV 60 y 120 mcg/ml.																	
Naturaleza de la Variación	Suma de Cuadrados				G.L.	Cuadrado Medio				Varianzas							
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$		$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	F	P	F	P	F	P	F	P
Entre Grupos	45.0	12.7		10.0	2	22.5	6.38		5.0	1.58	19.3	3.48	5.14			3.84	5.14
Entre Patrón y Problema	88.56	4.56	18.5	22.96	1	88.56	4.56	18.5	22.96	2.48	5.99	2.507	5.99	9.03	5.99	17.6	5.99
Regresión	2945.3	2790.7	3146.0	2995.0	1	2945.3	2790.7	3146.0	2995.0	82.7	5.99	1533	5.99	1535	5.99	2303.8	5.99
Desviación del Paralelismo	34.0	1.08	0.0075	2.803	1	34.0	1.08	0.0075	2.803	1.04	234	1.69	234	273.1	234	2.15	5.99
Error	214.0	10.97	12.29	7.8	6	35.66	1.82	2.048	1.3								
TOTAL	3327.0	2020.0	3176.7	3038.6	11												

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
MEDIA \bar{M}	2.29×10^{-2}	-1.19×10^{-2}	-2.32×10^{-2}	-2.61×10^{-2}
ACTIVIDAD (R)	105.4%	97.27%	94.62%	94.19%
LIMITES FIDUCIALES	± 0.0813	A- 87.5% ± 0.189 B- 127.1%	A- 93.11% ± 0.0818 B- 101.6%	A- 90.8% ± 0.0153 B- 97.5%

* Valores obtenidos de un promedio de 3 determinaciones.

METODO (B)

TABLA 5:
VALORES CORRESPONDIENTES A
LAS SEIS CURVAS ESTANDAR

	S ₁	S ₂	S ₃	U*	conc	%
1	.083	.240	.385	.261	65mcg	108
2	.103	.245	.410	.232	56.2	93.7
3	.150	.310	.498	.271	51.7	86.2
4	.124	.291	.426	.265	57.0	95.0
5	.148	.324	.480	.295	56.0	90.3
6	.120	.300	.570	.275	54.2	90.4

(*) Promedio de dos valores.

ANALISIS ESTADISTICO

METODO (B)

TABLA 6:

Grupo	%	d	d ²
1	107,9	- 14.04	197.12
2	94,4	- 0.54	0.291
3	87,4	6.46	41.73
4	91,4	2.46	6.05
5	91,0	2.86	8.17
6	91,1	2.76	7.61
Σ	563.2		260.971
\bar{M}	93.86		

$$\bar{V} = 7.224$$

$$CV = 7.69\%$$

$$E = 2.94$$

$$VR = \bar{M} \pm Et$$

$$t_{5\%} = 2.45$$

$$\text{Límite fiducial} = \pm 7.203$$

$$A = 86.65\%$$

$$B = 101.06\%$$

TABLA 7:

OBTENCION DE LA CURVA

ESTANDAR PROMEDIO

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum(dx \cdot dy)}{\sum dx^2} = 5.66 \times 10^{-3}$$

$$a = M_y - b M_x$$

$$a = 0.2891 - 5.66 \times 10^{-3} (60)$$

$$a = -5.062 \times 10^{-2}$$

Para 30 mcg/ml

$$y = -5.06 \times 10^{-2} + 5.66 \times 10^{-3} (30)$$

$$y = 0.1198$$

Para 60 mcg/ml

$$y = -5.06 \times 10^{-2} + 5.66 \times 10^{-3} (60)$$

$$y = 0.289$$

Para 90 mcg/ml

$$y = -5.06 \times 10^{-2} + 5.66 \times 10^{-3} (90)$$

$$y = 0.4595$$

TABLA 8

REGRESION LINEAL *

30 mcg/ml	60 mcg/ml	90 mcg/ml
0.083	0.240	0.385
0.103	0.245	0.410
0.150	0.310	0.498
0.124	0.291	0.426
0.148	0.324	0.480
0.120	0.300	0.570
0.728	1.710	2.760
0.1213	0.285	0.461

Y_1	dy	dy^2	Z_1	Dx	dx^2
0.1213	0.1678	0.0281	30	30	900
0.285	4.1×10^{-3}	1.68×10^{-5}	60	0	0
0.461	-0.1719	0.029	90	-30	900
0.8673		0.0576	180		1800
0.2891			60		

$$\sum (dx \, dy) = 10.191$$

$$\sqrt{(\sum dx^2) (\sum dy^2)} = 10.187$$

coeficiente de correlación:

$$r = \frac{\sum (dx \, dy)}{\sqrt{(\sum dx^2) (\sum dy^2)}} = 1.0004$$

$$G.L. = 6 - 2 = 4$$

$$r \text{ en tablas} = 0.811$$

(*) Para la curva total en donde cada valor es un promedio de 2 determinaciones.

TABLA 9

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS VALORES OBTENIDOS
CON LA CURVA ESTANDAR PROMEDIO

	A	conc.	%		d ²
1	0.261	55 mcg	91.6	1.85	3.42
2	0.232	49.5"	82.5	10.95	119.90
3	0.271	57.5"	95.8	- 2.35	5.52
4	0.265	55.5"	92.5	0.95	0.902
5	0.295	61.5"	102.5	- 9.05	81.902
6	0.275	57.5"	95.8	- 2.35	5.52
\bar{M}			560.7		217.16
\bar{M}			93.45		

$$\bar{V} = 6.59$$

$$CV = 7.05\%$$

$$E = 2.69$$

$$VR = M \pm E t$$

$$t_{5\%} = 2.45$$

$$\text{Límite Fiducial} = \pm 6.59$$

$$A = 86.86\%$$

$$B = 100.04\%$$

COMENTARIOS Y OBSERVACIONES

Del método (A).-

De la tabla No. 2.-

Se hace el análisis de acuerdo a lo establecido en las páginas 15, 16 y 17.

I. Para cada una de las dosis por separado

a.- Encontramos que para las series I, III, IV la variación entre grupos es significativa.

b.- Para la serie II, la variación entre grupos no es significativa.

II.

a.- Se encuentra que para las series I, III, IV la variación entre patrón y problema es significativa.

b.- Sin embargo para la serie II la variación - entre patrón y problema no es significativa.

III. La línea de regresión para todas las series es significativa.

IV. Para la desviación del paralelismo entre las - líneas dosis-respuesta se encuentra que son significativas.

De las tablas No. 3 y 4.

Estos valores corresponden al inciso 1.- b).- 2, - del Plan de trabajo.

Para las dosis de 20 y 40 mcg/ml.

I. Para los cuatro grupos se encontrará que los valores obtenidos para la variación entre grupos es significativa.

II. La variación entre patrón y problema, para todos los grupos es no significativa.

III. La línea de regresión para los cuatro grupos es significativa

IV. La desviación del paralelismo es no significativa para todos los casos.

Para la dosis de 30 y 60 mcg/ml.

I. La variación entre grupos para los cuatro grupos es no significativa

II. Para los valores de variación entre patrón y problema para los grupos 1 y 4 la diferencia es significativa; sin embargo para los grupos 2 y 3 no lo es.

III. Para la línea de regresión los valores son significativos para todos los grupos.

IV. La desviación del paralelismo no es significativa para todos los grupos.

Para la dosis de 40 y 80 mcg/ml.

I. La variación entre grupos, para todos los casos no es significativa

II. La variación entre patrón y problema no es -
significativa para todos los grupos,

III. La línea de regresión es significativa, para
todos los grupos,

IV. La desviación de paralelismo es significativa.
Para 60 y 120 mcg/ml.

I. Para todos los grupos la naturaleza de la va-
riación entre los grupos no es significativa.

II. La variación entre patrón y problema para los
grupos 1 y 2 no son significativas y para los grupos 3 y 4-
son significativas.

III. Los valores para la desviación de la regresión
son significativas para todos los casos.

IV. Para los grupos 1, 2 y 4 la desviación del pa-
ralelismo no es significativa, sin embargo para el grupo 3 -
si lo es.

METODO (B)

Se comparan estadísticamente las tablas 6 y 9 con
el fin de observar el mayor o menor grado de variación cuando
se compara una sola curva estandar (tabla 6) y otra con un -
número mayor de determinaciones (tabla 9), ésta última se ob-
tuvo por regresión lineal, en donde los límites fiduciales -
son más estrechos.

CONCLUSIONES

De manera general, las enzimas aumentan su actividad al aumentar la temperatura- hasta cierto limite - sin embargo en el presente estudio, la actividad fué mayor en el Método A, donde la temperatura usada fué de 35°C; que en el Método B, en el cual la temperatura se llevó a 40°C. Esta discordancia parece ser, debida a que, en el Método A se utilizó como disolvente de la enzima una solución de cloruro de calcio.

A partir de las observaciones se pueden obtener básicamente las siguientes conclusiones, basadas en el grado de variación de todos y cada uno de los sistemas empleados:

METODO A:

Serie I	:	\pm	6
Serie II	:	\pm	4.5
Serie III	:	\pm	7
Serie IV	:	\pm	8

METODO B :

Tabla 6	:	\pm	7.2
Tabla 9	:	\pm	6.5

Se puede concluir que las variaciones en sí, son bastante grandes, sin embargo existe una serie, la número - II, en la cual éstas son menores, por lo cual y con ciertas limitaciones se recomienda trabajar a esa concentración.

Se observa, para todas las series, aún divididas - en grupos, que la desviación de la regresión es significativa en todos los casos, posiblemente se puede corregir haciendo la relación de las dosis 1:3 en lugar de 1:2.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Harrow, B., Mazur, A., Bioquímica Básica. 9a. ed. Ed. Interamericana, S.A. (1967).
- 2.- Kimball, John W. Biología, Fondo Educativo Interamericano. Centro Regional de Ayuda Técnica. México (1971)
- 3.- Nelson, Alvin, Biología. Ed: Limusa-Wiley Co. México - (1969).
- 4.- Goodnight, C. J., Goodnight, M.L. and Armacost, R.R. - Biology: An Introduction to the Science of life. John Willey and Sons Inc. New York (1962).
- 5.- Cantarow, A. y Schepartz, B., Bioquímica. 3a. ed. Editorial Interamericana, S.A. México (1962).
- 6.- Harper, H.A. Manual de Química Fisiológica. 2a. ed. El Manual Moderno, México (1969).
- 7.- Fruton, J.S. and Simmonds, S. General Biochemistry. 2a. ed. John Wiley and Sons, Inc. New York (1953).
- 8.- Keller, P.J. Cohen, E. Neurath, H.J. Biol. Chem. 233, - 344 (1958).
- 9.- Marchis-Mouren, G. Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 2257, -- (1965).
- 10.- Neurath, H. and Dreyer W.J., Discussions Faraday Soc. - No. 20 Aderdeen University Press (1955).

- 11.- Neilands, J.B. and Stumpf, P.K. Outlines of Enzyme Chemistry. 2a. ed. John Wiley and Sons, Inc. New York -- (1958).
- 12.- Norrothopo, J.H., Kunitz, M. Art. Herriott, R.M. Crystalline Enzymes. 2a. Ed. Columbia University Press. N.Y. (1948).
- 13.- Cunningham L.W.J. Biol. Chem. 211, 213 (1954).
- 14.- Tietze, F.J. Biol. Chem. 204, 1 (1953).
- 15.- Hofmann, K. and Bergman. J. Biol. Chem. 138, 243 (1941)
- 16.- Neurath, H. and Schewart, G.W. Chem. Rev. 46, 69 (1950)
- 17.- Dixon, M. and Webb, E.C. Enzymes. Longman Green and Co. London. (1959)
- 18.- Bier, M., Tierminiello, L. and Nord, F.F. Arch. Biochem. Biophysics 211, 230 (1952).
- 19.- Mc. Donald, M.R. and Kunitz, M.J. Phisiol 25, 53 (1941)
- 20.- Bier, M. and Nord, F.F. Arch. Biochem. Biophysics 33, - 320 (1951).
- 21.- Giorini, L. Félix, F. Biochim et Biophys. Acta 11, 535- (1953).
- 22.- Green, N.M. and Neurath, H.J. Biol. Chem. 204, 379 (1953)
- 23.- Davie, E.W. and Neurath, H.J. Biol. Chem. 212, 515 (1955)
- 24.- Desnuelle, P. and Fabre, C. Biochim et Biophys. Acta 18, 49 (1955).

- 25.- Yamashina, I. Acta. Chem. Scand. 10, 739 (1956).
- 26.- Kunitz, M.J. gen. Physiol. 30, 291 (1947).
- 27.- Bettelheim, F. R.J. Biol. Chem. 212, 235 (1955)
- 28.- Neurath, H. and Dixon, G.H. Federation Proc. 16, 791 (1957).
- 29.- Laskowsky, M.J. Biol. Chem. 213, 609 (1955).
- 30.- Fruton, S.S. J. biol. and Med. 22, 263. (1960)
- 31.- Fox, S. W. and Foster, J.F. Protein Chemistry, John - Wiley and sons Inc. N. Y. 1957.
- 32.- Agreen, G. Et. Al. Acta Chem Scand. 5, 324, (1957)
- 33.- Perlmann, G.E. Advances in Protein Chem. 10, 1 (1951)
- 34.- Derechin, M.J. Biochem. 78, 443 (1962)
- 35.- The National Formulary XIII. 13a. Ed. Am. Pharmaceutical Ass. Washington D.C. (1970)
- 36.- British Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press. Londres 1968.
- 37.- Bauer, Ch. W. and Vazakas, A.J. J. Am. Ph. 40, 552 (1951)
- 38.- E. Levin, U.S. Patent Chem. Abst. 2, 503. 1947
- 39.- British Patent. Chem. Abst. 25, 10(1960)
- 40.- U.S. Patent. Chem. Abst. 7. 1 (1963)

- 41.- U.S. Patent. Chem. Abstr. 22, 3 (1963)
- 42.- Arkin H. and Colton, R.R. Tables for Statisticians. -
2nd. Ed. Barnes and Noble Inc. New York (1970)
- 43.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 3a.
Ed. México (1962).
- 44.- Pharmacopoes Helvetica. Editio sexta. Tomo II. Officie
Central Federal des Impimes et dumatril (1971).
- 45.- The Pharmacopoea of Japan Part I. 7th. Ed. Hirokawa -
Publishing Company Inc. (1971)
- 46.- State Pharmacopoeia of the Union of Soviet Socialist
Republics Ninth Edition. Moscow (1961)
- 47.- Farmacopea Ufficiale de III Republica Italiana. Settima
Edizione Roma (1965).
- 48.- International Commission for the Standardisation of
Pharmaceutical Enzymes. Fourth Reprt. The Assay of
Pancreatina (1968)
- 49.- Ulacia, E.R., Control de Medicamentos, Apuntes no
publicados.

ESTA TESIS FUE IMPRESA EN
VEGA IMPRESORES S. de R. L.
OFICINAS EN AV. UNIVERSIDAD No.
1855 TEL. 548-73-48 TALLERES
EN SUR 107 No. 1609 COL.
AERONAUTICA MILITAR TEL. 552-66-97
SERVICIO A DOMICILIO