

# UNIVERSIDAD LABASTIDA

INCORPORADA A LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

*Facultad de Ciencias Químicas*

ENSAYO POTENCIOMETRICO DE LAS ENZIMAS  
"FOSFATASA LACTEA"

T E S I S

QUE PARA EXAMEN PROFESIONAL DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA LA SENORITA

*Ana María Gorozpe Vila*

MONTERREY, N. L.

— 1960 —



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.

*ENSAYO POTENCIOMETRICO DE LAS ENZIMAS*  
*"FOSFATASA LACTEA"*

*DIRECTOR DE TESIS*

*R. T. MANUEL PANCI*

*En la fe, el espíritu descansa;*

*en la razón, vive;*

*en el amor, goza;*

*sólo en el dolor adquiere conciencia.*

*AL QUE LO ES TODO.  
POR QUIEN SOY Y EXISTO.*

*A la memoria de mis queridos Padres  
SR. LIC. LUIS GOROZPE*

!

*SRA. LUZ VILA DE GOROZPE*

*quienes me condujeron sabiamente por el recto camino.*

*A MIS HERMANOS.*

*CON CARLOS*

*A la Universidad Labastida,  
a todos mis Maestros, especialmente al Sr. Q. T. Manuel Rangel  
de quien recibí valiosas orientaciones  
en el presente trabajo.*

# ENSAYO POTENCIOMETRICO DE LAS ENZIMAS FOSFATASA LACTEA

## I. INTRODUCCION

1. Definición
2. Formación de las enzimas
3. Estructuras de las enzimas
4. Mecanismo de la acción enzimática
5. Métodos de estudio
6. Clasificación de las enzimas

## II. METODOS DE TRABAJO

1. Fundamento
2. Modificación
3. Aparatos empleados
4. Reactivos
5. Técnica

## III. RESULTADOS

1. Tablas
2. Gráficas
3. Ajuste de curvas

## IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

## V. BIBLIOGRAFIA

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

Definición. -Las enzimas son los catalizadores proteicos que inician o modifican la velocidad de reacción de un proceso bioquímico.

Un catalizador, según la teoría clásica, es una substancia que sólo actúa por contacto o que se regenera durante un ciclo de reacciones (1, 2).

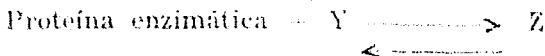
Esta definición no se ajusta completamente a las enzimas; puesto que algunas de ellas son destruidas durante el proceso catalítico. La diferencia es que las enzimas son iniciadoras de algunas reacciones, mientras que los catalizadores, propiamente dichos, no inician sino sólo modifican las velocidades de reacciones químicas que, aún sin el catalizador, estaban ocurriendo, además, son capaces de orientar procesos nuevos (3).

Es posible que estas diferencias sean más aparentes que reales, ya que la iniciación de reacciones puede deberse a la formación inicial de compuestos entre la enzima y alguno de los componentes del medio; de igual manera se puede explicar la orientación de reacciones.

Supongamos, para aclarar lo anterior, que la reacción que se verifica con o sin catalizador se represente por



pero Z es a su vez una combinación de las proteínas enzimáticas y de un factor Y.



se ve claro que mientras no exista la substancia Z no puede ocurrir la catálisis y por eso aparentemente la enzima actúa de manera diferente que los demás catalizadores.

La propiedad de orientar reacciones específicas puede deberse también a que, durante el proceso de la catálisis, alguna de las reacciones que ya existen, pero con velocidad inapreciable, adquieren mayor velocidad, bien porque desaparezcan algunas reacciones de competencia, o bien porque se destruyan los inhibidores del catalizador.

Los primeros conocimientos sobre las enzimas se deben probablemente a Spallanzani; pero un estudio completo se encuentra hasta 1833 en que Payen y Perroz estudian la amilasa y su acción sobre los almidones (4).



El nombre de enzima fue propuesto por Kühne en 1878 (5). Un poco después en 1898 Duclaux propuso la terminación *asa* utilizada hasta nuestros días.

Formación de las enzimas. Las enzimas son sustancias proteicas; así que, los problemas de su síntesis, son similares a los problemas de la síntesis proteica.

Las proteínas se sintetizan en el interior de las células a partir de los amino-ácidos de la alimentación. En los vegetales y en los organismos inferiores, las síntesis es más completa, puesto que se inicia con sustancias inorgánicas sencillas como el amoníaco, agua y el anhídrido carbónico.

Beable demostró que la formación de las enzimas está determinada por un gene particular; destruyendo éste con rayos X en la neurospora crasa, ésta pierde la posibilidad de sintetizar vitaminas, amino-ácidos, etc. (6).

En esta síntesis seguramente intervienen como catalizadores diversos iones como el cobre, el hierro, etc. Hasta hace poco tiempo se suponía que las proteínas eran sustancias de vida corta; pero recientemente, con la ayuda de isótopos radio-activos se ha comprobado que aunque algunos de los amino-ácidos de la molécula proteica se pierden y reponen con cierta velocidad la molécula en conjunto permanece estable durante mucho tiempo. (7).

En el caso de la proteína enzimática, se ha demostrado que su síntesis no sólo se verifica en los órganos vivos sino aún en cortes de tejidos y en extractos libres totalmente de células. (8).

La enzima considerada como proteína no presenta particularidad ninguna, que la diferencie de las proteínas no catalíticas; como éstas, sus pesos moleculares van desde doce mil en la ribo-nucleasa hasta un millón en la hidrogenasa glutamato. (9).

La distribución de los amino-ácidos tampoco revela una diferencia en las proteínas comunes. El estudio de su estructura ha demostrado que se encuentra tanto en forma globular como espiraliforme. En el caso de las proteínas simples, las enzimas globulares forman esferoides en los que los radios pueden llegar hasta una relación de 1:5; en las moléculas espiraliformes también como en las proteínas, la estabilidad de la forma parece que se logra con la presencia de puentes de hidrógeno. (10).

La enzima tiene la propiedad de coexistir dentro de su molécula, a veces en forma de verdadera combinación y a veces en forma de adsorción, moléculas o radicales de peso molecular bajo y con frecuencia inorgánicos, que reciben el nombre de agrupamiento prostético y constituyen los centros activos.

Otra característica es su gran poder de adsorción que hace que el sustrato rodee completamente a la molécula, permitiendo la reacción específica.

Se ha propuesto denominar holoenzima a la molécula completa que estará construída por la apoenzima (proteína) y coenzima (grupo prostético) y así podrá representarse la activación de una enzima por el equilibrio.

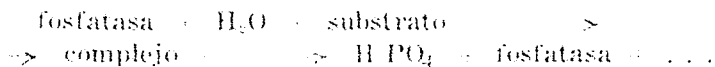


Mecanismo de la reacción.—Mecanismo de la catálisis. Sabemos que para que dos sustancias reaccionen es necesario que se pongan en contacto y que exista una energía suficiente que recibe el nombre de energía de activación. En ausencia de catalizadores muy pocas moléculas llegan a poseer esta energía y por eso la velocidad de reacción es muy lenta; el catalizador tiene la propiedad de disminuir la energía de activación necesaria y con esto aumenta el número de moléculas que pueden reaccionar, o sea la velocidad de reacción.

La explicación anterior no indica cuál es el mecanismo de estas reacciones y es aquí donde encontramos una gran variedad de teorías, de las cuales ninguna tiene carácter absoluto.

Las teorías existentes Bayliss (12), Haldane (13), Euler (14), Quastel (15), Massey (16), Dixon M. (17), Leach (18), (19), (20) pueden reunirse en tres grupos:

1o. Un grupo de teorías (12) (13) (14) supone que el sustrato se combina con la enzima formando una substancia intermedia, inestable, la que posteriormente se descompone en nuevos productos y la enzima regenerada. En el caso particular de la fosfatasa podría representarse de la siguiente manera:



Este punto de vista equivale a suponer que las substancias que van a reaccionar se depositan transitoriamente sobre la enzima, aumentando con ésto su concentración, que sería la razón determinante del aumento de velocidad de reacción.

2o. Otro grupo de teorías más modernas (15) (16) considera la estructura electrónica y la polarización como determinantes, de una manera general, se supone que en la combinación enzima sustrato, el orbital molecular del complejo tiene una orientación tal que forma, en ciertos puntos, mayores densidades electrónicas que representarían los puntos activos y que actúan como centros de oxidación, reducción o atracción iónica.

3o. El tercer grupo, también moderno, (17) (18) estudia principalmente la velocidad de reacción y encuentra que la ecuación que la representa, casi siempre tiene exponentes fraccionarios, lo que daría un indicio de que se trata de reacciones en cadena.

La teoría de mayor importancia, tanto por su extensión como porque de ella se han derivado otras teorías, es la de Michaelis (19) (20). Este investigador estudia a las enzimas desde el punto de vista cinético.

Una enzima es un catalizador o sea un modificador de la velocidad de reacción. La variación de la velocidad depende, entre otras cosas, de la clase de catalizador; en los fermentos se caracteriza la acción por la "actividad específica" que es la actividad media por unidad de enzima y se representa de diferentes maneras:

1. Por número de transformación que es el número de moléculas de substrato transformadas por moléculas de enzima minuto (21).

2. Por el número de mili-moles de substrato transformado en una hora y por miligramos de enzima.

3. Por la relación constante de velocidad de reacción sobre miligramos de enzima.

4. Por el índice de regeneración moles de substrato por minuto y por centro activo. Este valor es muy importante porque representa el número de veces que se regenera el centro activo en un minuto, o sea la periodicidad de regeneración. (22).

La velocidad de reacción se define como el número de moles transformadas por unidad de tiempo, pero en las enzimas da una idea más clara la definición de Nerst.

$$\text{Velocidad de reacción} = \frac{\text{fuerza química o afinidad}}{\text{resistencia química o resistencia cinética}} \quad (23)$$

Michaelis supone que en la enzima existen ciertos radicales o estructuras capaces de combinarse con el substrato, a éstos los llama centros activos, y desde el punto de vista cinético se puede escribir en esta forma:



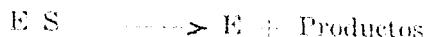
en la que:

E representa el o los centros activos de la enzima

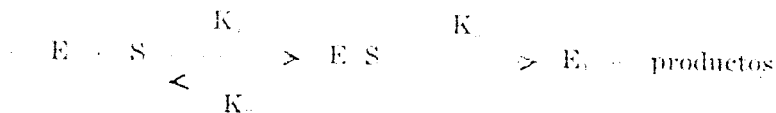
S el substrato y

ES el complejo enzima substrato.

A continuación el complejo se destruye casi instantáneamente regenerando a la enzima y dando los productos finales.



Según esta manera de considerar el fenómeno, se trata de una reacción consecutiva en la que el producto intermedio desaparece casi tan rápidamente como se forma, ésta es la característica que en Físico-Química se llama "Reacción en cadena de concentración intermedia constante" y puede escribirse de la siguiente manera:



La velocidad para la segunda reacción será:

$$\text{Velocidad} = \frac{d(\text{productos})}{d(t)} = K_3 [ES]$$

Y la reacción completa:

$$\frac{d(\text{producto})}{d(t)} = \frac{K_1 K_3 [E] [S]}{K_2} \quad (24)$$

Para la medida de las concentraciones se utiliza la ley de la acción de las masas en la que se ha modificado ligeramente la notación original.

Esta ecuación es:

$$K_s = \frac{(e-p)}{p}$$

en la que:

$K_s$  = constante de equilibrio de la formación del complejo.

$e$  = concentración total de enzima

$p$  = concentración del complejo de donde:

$(e-p)$  = concentración de la enzima libre y

$s$  = concentración del sustrato.

Otra forma de considerar estas reacciones es comparar la velocidad en las condiciones dadas, con la velocidad que se obtendría si las condiciones fueran óptimas, o sea, con la máxima velocidad.

Por este procedimiento se ha llegado a la ecuación

$$v = \frac{V \cdot s}{K_m + s}$$

en donde:

- v = velocidad en ciertas condiciones
- V = velocidad máxima cuando el sustrato sature totalmente la enzima
- s = concentración del sustrato
- K<sub>m</sub> = constante de Michaelis

Como tan pronto como se inicia la acción catalítica los mismos productos actúan casi siempre como inhibidores, la ecuación anterior sólo corresponde a la primera parte del fenómeno. El mismo Michaelis deriva otra ecuación en la que se tiene en cuenta esta inhibición.

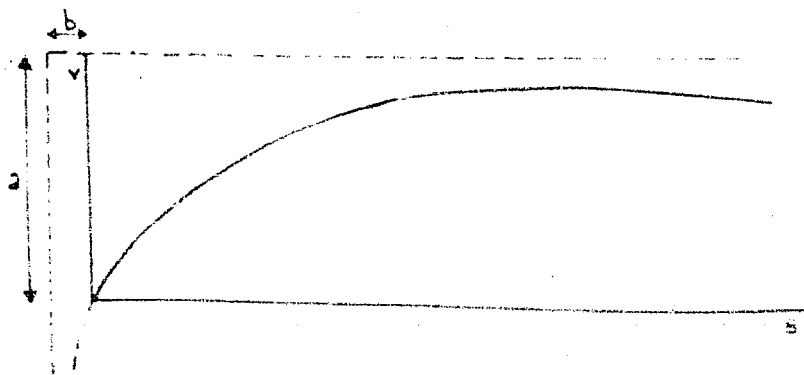
$$v = \frac{V \cdot s}{K_m \left( 1 + \frac{i}{K_i} \right) + s}$$

en la que:

- v i = concentración de los productos formados que inhiben la reacción
- K i = constante de disociación del complejo enzima - inhibidor.

En estas ecuaciones si se grafica velocidad contra concentración del sustrato resultan hipérbolas que corresponden de una manera aproximada a la ecuación

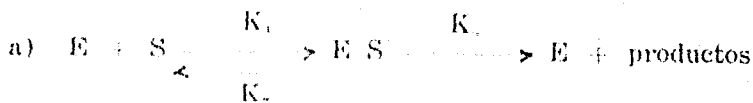
$$(a - v) (b + s) = K$$



Forma hipérbolica teórica de sustrato-velocidad.

Sin embargo, cuando existe una impureza capaz de bloquear la enzima, la curva no parte del origen.

Un tratamiento matemático ligeramente diferente es el de Briggs Haldane (25). En éste se considera la formación y descomposición del complejo tan rápida que pueda depreciarse y representarse el fenómeno por una ecuación única.



en donde:

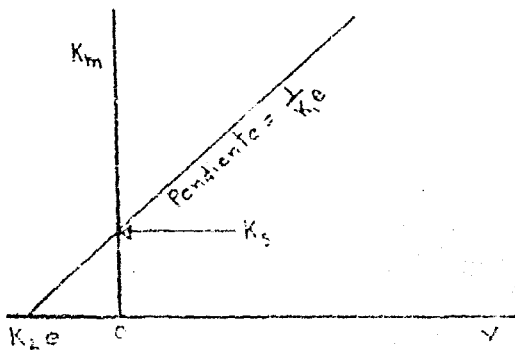
$$b) \quad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$c) \quad V = K \cdot e$$

Estas constantes están ligadas por la ecuación:

$$K_m = \frac{K \cdot V}{K_i \cdot e}$$

que pueden resolverse gráficamente si se mide  $K_m$  a diferentes velocidades máximas, y para diferentes temperaturas a pH constante.

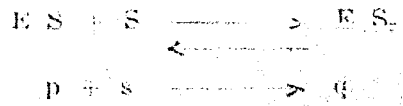


Extrapolación para obtener  $K_m$  y  $K_s$

La cinética enzimática se complica porque el substrato actúa en algunas ocasiones como inhibidor y en otros como activador.

La inhibición puede deberse a que el substrato satura los puntos activos de la enzima, formando complejos estables y por lo tanto impidiendo la regeneración de la enzima.

Este fenómeno se puede representar por la ecuación



En la que:

$E \cdot S$  ó  $p$  = representa el complejo activo

$S$  = exceso del sustrato

$E \cdot S_2$  ó  $q$  = el complejo inactivo

Aplicando la ley de la acción de las masas resulta:

$$p \cdot s = K_s \cdot q$$

En la que:

$K_s$  = representa la constante de equilibrio en la forma del complejo inactivo.

Introduciendo este valor en la ecuación de Michaelis.

$$v = \frac{K_e}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{K_s^2}{S^2}}$$

Por otra parte, para explicar que el sustrato pueda actuar como activador se ha supuesto que en la enzima pueden existir dos clases de centros activos, unos en los cuales se verifica la reacción enzimática de manera ordinaria y otros en los cuales se puede fijar el sustrato sin que ocurra reacción enzimática pero formándose una nueva molécula de mayor actividad.

Massey (26) expresa esta propiedad con las ecuaciones



En la que:

$E \cdot S_a$  representa a la enzima activada la que reaccionaría con nuevos sustratos para formar el complejo activo.



CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS.—No existe una clasificación precisa de las enzimas, la mayoría de las propuestas se fundan en la acción principal que ejerce la enzima sobre el sustrato y, bajo este punto de vista, las enzimas se clasifican en (27) (28).

1.- Hidrolizantes

- a) Peptidasas
- b) Amilasas
- c) Esterasas
- d) Glucosidasas
- e) Anhidrasas
- f) Descarboxilasas no oxidantes
- g) Varias

Carboxilasa  
Fosfatasa  
Sulfurilasa  
Tioestercorosa

2.- Transferencia

- a) Oxido reductasa
- b) Isomerasas  
(Cambio de hidrógeno de aldosa a cetosa)
- c) Transferasas de radicales fosfato (fosforilasas)
- d) Trans-acilasas
- e) Transferasas de grupos nitrogenados
- f) Transglucosidasas
- g) Transcoenzimasas
- h) Transmetilasas
- a) Hidrasas de hidrasas
- b) Sintetasas
- c) Adición a doble ligadura
- d) Estereoisomerasas

Oxidación amino-ácidos  
                  aceto-ácidos

Oxidación de grupos  
                  hidrocarbonados

Oxidación de alcoholes

Deshidrogenación de  
                  saturado a olefina

Oxido-reducción de  
                  mercaptano a  
                  sulfónicos

Peroxidasas

3.- Acciones di-  
versas



**FOSFATASA.**—Bajo este nombre se encuentra un gran número de enzimas que con frecuencia presentan cierto carácter isodinámico, es decir, enzimas diferentes que actúan sobre el mismo sustrato sólo que a pH diferente.

Folley y Kay han dividido a las enzimas en cuatro grupos aunque otros autores como Jean Roché y Nguyen-Van Thoal (29) consideran suficiente clasificarlas en fosfatasa ácidas y alcalinas, éstas actúan a un pH cercano a 9 mientras que las ácidas tienen pH óptimos entre 3.5 y 6.

Las fosfatasas alcalinas, a las cuales pertenece la de la leche, se encuentran principalmente en los tejidos animales, mientras que las fosfatasas ácidas son propias de los tejidos vegetales en los que algunas de ellas intervienen en la síntesis de las grasas.

## MÉTODOS DE ESTUDIO

La medida de la actividad de las enzimas se puede efectuar por dos clases de métodos diferentes:

1. —Métodos de muestreo
2. —Métodos de medida directa

En los métodos de muestreo, cada determinado tiempo se separa una porción de problema y se efectúa la medida por un procedimiento adecuado; por ejemplo, tratándose de la *invertasa* se mide la desviación óptica; en las hidrolasas se mide la variación de acidez o alcalinidad.

Estos métodos tienen el inconveniente que, entre la toma de muestra y el momento de la lectura, transcurre un tiempo durante el cual la reacción enzimática continúa verificándose en condiciones no controladas y, por esto, si la velocidad de reacción es grande, es difícil obtener conclusiones definidas.

En los métodos de lectura directa se sigue la reacción, mientras se está verificando. Existen diversos procedimientos para seguir esta reacción, entre éstos se encuentran los *Métodos Colorimétricos* que son los más usados por su relativa sencillez; *Métodos Refractométricos* que pueden seguirse cuando hay formación o desaparición de dobles ligaduras, ya que ésto produce exaltaciones o depresiones muy grandes del índice de refracción. *Métodos volumétricos* en los cuales se trata de mantener constantes las condiciones iniciales preparando un reactivo adecuado, a esta clase de valoración pertenece al Método que dio origen a esta tesis. (30).

*Métodos potenciométricos* que según algunos autores no son convenientes porque a medida que progresa la reacción los productos o modificaciones sufridas por la enzima, las coenzimas y el substrato introducen nuevas variables que dificultan el análisis matemático del resultado; sin embargo, si se toma la velocidad inicial (31), o sea la derivada de la función, se obtiene una línea recta que es independiente de los procesos posteriores y que puede emplearse para caracterizar a la reacción enzimática.

## II METODOS DE TRABAJO

Fundamento.--La tesis se inspiró en un trabajo de Martín Schwartz y Terrel C. Myers presentado bajo el título "Simple Microtitrimetric Constant-pH Method for Accurate Enzyme Assays" en la revista Analytical Chemistry de Junio de 1958 Pág. 1111.

En este artículo se estudia la posibilidad de valorar volumétricamente las cantidades de ácido o de base formadas durante una reacción enzimática empleando una microbureta y un potenciómetro. En términos generales, el método consiste en agregar, a tiempos conocidos, suficiente ácido o base para mantener el pH constante graficando posteriormente equivalentes gastados contra tiempo, así se obtienen curvas de tipo parabólico o hiperbólico de acuerdo con la teoría expuesta en el capítulo anterior.

En las experiencias iniciales se hicieron dosificaciones del ácido formado empleando un método semejante al de Schwartz, pero se encontró que había mayor regularidad y se simplificaba el trabajo transformando los pH a concentración de iones hidrógeno multiplicando por un factor adecuado.

Por esta razón todo el trabajo se desarrolló únicamente con el Potenciómetro.

En esta tesis se tomó como sujeto a la fosfatasa de la leche. En general, las fosfatasas liberan restos ácidos durante su reacción. Existen numerosas fosfatasas, entre otras:

FOSFATASA. Fosfoamilasa. (Tejidos de los animales).

FOSFOLIPASA. a) En el veneno de los escorpiones y en algunas bacterias.

FOSFOLIPASA. b) En los tejidos de los animales y en algunos hongos.

FOSFOMONOESTEARASA.- (1) Se encuentra en los tejidos animales y en la leche.

FOSFOMONOESTEARASA.- (2, 3, 4) En los tejidos de los animales, en las levaduras y en los animales. Estas enzimas catalizan la esterificación o hidrólisis de los ésteres fosfóricos así como algunas fosforilaciones.

**FOSFATASA FOSFO-PROTEICA.** Se encuentra en los tejidos animales y actúa sobre la caseína y otras fosfo-proteínas.

**FOSFORILASA-FOSFATASA.**—Se encuentra en los tejidos de los animales.

**GLUCOSA 6 FOSFATASA.**—Se encuentran en el hígado y actúa sobre el fosfato d. glucosa 6. Ester de Robinson.

**GLUCOSA 1 FOSFATASA.**—Se encuentra en la sangre desfibrinada que hidroliza la glucosa 1 fosfato. Ester de Cori.

**HEXOSA DIFOSFATASA.** Actúa sobre la glucosa 1, 6 difosfato. Ester de Harden.

**PIRO-FOSFATASA INORGANICA.**

**POLI-META-FOSFATASA.** En la levadura.

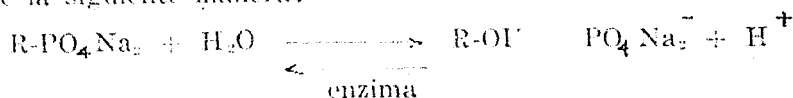
**ADENOSIN DIFOSFATASA.** En los músculos.

**ASPIRASA.** En las plantas, papa, etc.

**NUCLEOSIDO DIFOSFATASA.** En el hígado y en los riñones.

**FOSFO CETOLASA.** L. Actuasil.

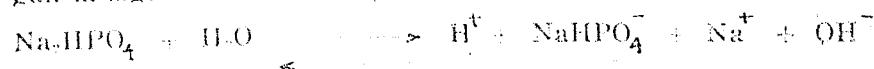
En la leche existe una alcalino-fosfatasa (fosfomonoestearasa 1) la cual activa el desdoblamiento de mono-ésteres del ácido fosfórico, así como produce transfosforilaciones. La hidrólisis del éster se puede representar de la siguiente manera:



Como se ve durante esta reacción por cada molécula de éster aparece un ión hidrógeno.

La fosfatasa de la leche no sólo actúa sobre los ésteres sino que es capaz de correr el equilibrio de las mezclas de fosfato disódico e hidróxido de sodio.

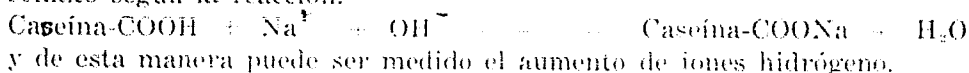
El fosfato disódico al disolverse en agua se hidroliza y disocia según la siguiente reacción:



la fosfatasa corre este equilibrio hacia la derecha, es decir, produce un aumento de iones hidrógeno.

En el equilibrio existen iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{OH}^-$  en concentración alta, puesto que el  $\text{NaOH}$  es una base fuerte, el aumento de iones hidrógeno sería inapreciable sino hubiera una substancia capaz de fijar el  $\text{NaOH}$ .

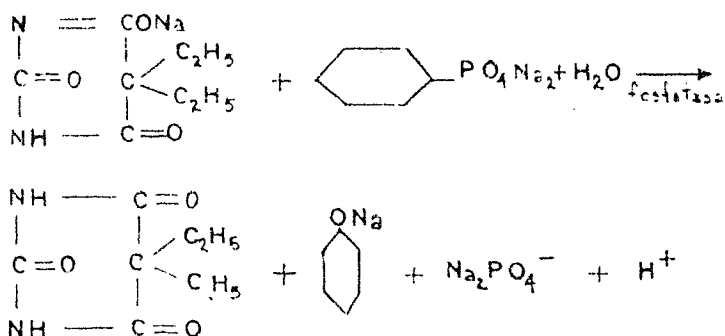
En la leche los restos ácidos de la caseína fijan al sodio como caseinato según la reacción.



### MODIFICACION DE LA TECNICA

En el presente trabajo se estudiaron tres sistemas:

1.- Sistema veronal sódico, fosfato fenil disódico que bajo la acción de la fosfatasa da iones fosfato disódico y iones hidrógeno.



2.- Sistema de fosfato disódico e hidróxido de sodio (ya mencionado).

3.- Sistema de glicerofosfato disódico.



En cada uno de estos sistemas se estudió:

- La influencia del pH inicial entre 8.2 y 8.8
- La influencia de la concentración relativa de la fosfatasa; tomando como 100% la contenida en la leche fresca, y por diluciones se lleva a concentraciones de 60% y 20%.

En cada caso el sistema se mantuvo en un baño a temperatura constante de 38 grados y se midió la variación de acidez a tiempos conocidos, empleando el Potenciómetro.

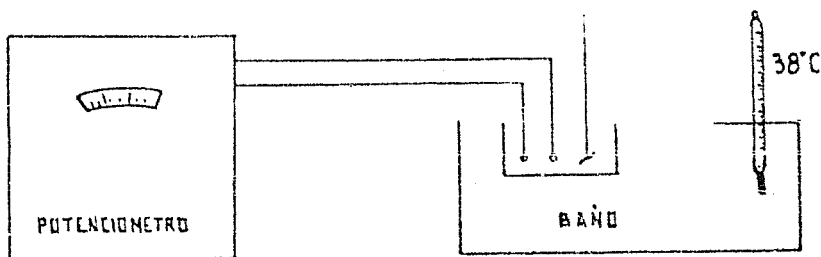
Como hemos dicho antes, los métodos potenciométricos o, en general, las medidas a pH variable tienen el inconveniente de que se modifica la velocidad de reacción como consecuencia de la variación de acidez o alcalinidad, sin embargo, en nuestro caso el fin que se persiguió fue establecer la ecuación de la curva para calcular la pendiente en el origen que si tiene una significación analítica particular.

Todas las medidas se hicieron por quintuplicado, y los resultados que aparecen más adelante en las tablas son promedios de estas cinco lecturas; por eso aparecen aproximaciones hasta el centésimo, aunque el aparato sólo mide décimos de pH.

## APARATOS EMPLEADOS

Se utilizó un Potenciómetro marca Radiometer Copenhagen con electrodos de vidrio y calomel.

Estos electrodos se introducen en la solución en estudio que está contenida en un vaso que, a su vez, se encuentra en un baño de temperatura constante.



Esquema del aparato.

## R E A C T I V O S

I.—Para el sistema luminal sódico, fenil disódico se utilizó:

1. Una solución normal de NaOH
- 2.—Una solución de veronal fosfato preparada disolviendo:
 

fosfato fenil disódico	0.545 grs.
veronal	5.77 grs.
agua	la necesaria para 500 mililitros y

 agregar unas gotas de cloroformo.
- 3.—Una solución de HCl .01 Normal.

II.—Para el sistema fosfato disódico sosa cáustica se utilizó:

1. Una solución de fosfato disódico con 7 moléculas de agua, al 2%. esta solución contiene .0787 milimoles de fosfato por mililitro.
- 2.—La misma solución de NaOH del sistema anterior.
- 3.—Solución de HCl .01 Normal.

III.—Para el sistema de glicerofosfato se empleó:

- 1.—Una solución de glicerofosfato de sodio al 1%.
- 2.—Una solución de NaOH .04 Normal.
- 3.—Una solución de HCl .01 Normal.

# T E C N I C A

En el baño a temperatura constante se coloca la leche, agua y el reactivo, cada uno por separado.

Cuando estas sustancias alcanzan la temperatura del baño (38 grados Centígrados) se toma una cantidad determinada de leche (25 - 15 - 5, mililitros) se mide su pH y se agrega a continuación reactivo suficiente para tener un volumen total de 30 mililitros (5 - 15 - 25 mililitros), nuevamente se toma el pH y se ajusta con el hidróxido de sodio (NaOH) o el ácido clorhídrico (HCl) a un pH determinado (8.2 - 8.5 - 8.8), se mantiene a una agitación constante y se mide el pH a los 2, 5, 10, 15 y 20 minutos.

	Tubo No. 1	Tubo No. 2	Tubo No. 3
Leche	25 ml.	15 ml.	5 ml.
Reactivos	5 ml.	15 ml.	25 ml.

Ajustar al pH deseado.

### III RESULTADOS

Los resultados se expresan a continuación en tres formas diferentes:

1. *En tablas.* En éstas, se tabulan los resultados a los pH estudiados (8.2 - 8.5 - 8.8 y en el caso del fosfato de sodio 9.1).

Para cada pH se estudian tres concentraciones relativas de fosfata: 100%, 60% y 20%; en cada uno de estos casos en los encabezados de las columnas se indica la concentración del ión fosfato del reactivo agregado expresado en milimoles por litro de sistema completo.

Para cada concentración aparecen dos columnas:

1.—En la que se expresan los promedios de cinco lecturas de pH para cada tiempo, la concentración correspondiente del ión hidrógeno multiplicado por el factor  $10^8$  con el objeto de tener números de fácil representación.

#### II.—Resultados en gráficas

Para cada reactivo estudiado se presentan:

1.—Una primera gráfica en la que se representan las concentraciones de iones hidrógeno contra el tiempo a los pH estudiados.

2.—Gráficas. Cada una de ellas para un pH inicial y en las que se grafica el aumento de concentración de ión hidrógeno contra tiempo, la curva ajustada matemáticamente y las cantidades de ión hidrógeno producidas entre cada intervalo de tiempo.

III.—La explicación del ajuste matemático utilizado con el desarrollo completo de dos ejemplos.

El ajuste matemático de la curva es indispensable para poder calcular analíticamente la pendiente en el origen.

Recordaremos que para esta clase de ajuste se procede por tanteo, primero viéndose si la gráfica tiende a una recta en cuyo caso la función es del tipo:

$$y = mx + b$$

Si la gráfica representa una curva, se repite en papel semilogarítmico y si en éste la línea tiende a la recta, la función será de la forma:

$$y = a \cdot b^x$$



Si no resulta línea recta se representan los valores en papel logarítmico, y si en éste resulta una línea recta, la función es del tipo:

$$y = a(x)^b$$

Si estos artificios fallan, lo más común es suponer que la curva representa una parte de la parábola y su ecuación general será:

$$y = C_0 + C_1 x + C_2 x^2 + C_3 x^3 \dots \text{etc.}$$

En esta ecuación el problema consiste en encontrar los valores de las constantes. Todavía en el caso de curvas particulares en las que pueda sospecharse que sean funciones cónicas diferentes de la parábola, se hace un ajuste considerando cuatro o cinco puntos de la curva en el supuesto que la ecuación general sea del tipo:

$$a(x)^2 + bxy + cy^2 + dx + ey + f = 0$$

En el problema particular varios autores mencionan el tipo hiperbólico de las acciones enzimáticas; por éste se siguió esta clase de ajuste y sólo cuando las desviaciones entre la curva ajustada y la curva experimental eran muy grandes se recurrió al ajuste parabólico.

Como ejemplo de este trabajo ponemos a continuación las operaciones con las que se obtuvieron las curvas teóricas de las gráficas 3 y 4 (Cálculos).

#### Ejemplo de ajuste parabólico:

$H = C_0 + C_1 t + C_2 t^2$ $.14 = C_1 \cdot 2 + C_2 \cdot 4$ $.48 = C_1 \cdot 5 + C_2 \cdot 25$ $.82 = C_1 \cdot 10 + C_2 \cdot 100$ $1.62 = C_1 \cdot 15 + C_2 \cdot 225$ <hr style="border: 0.5px solid black;"/> $3.06 = C_1 \cdot 32 + C_2 \cdot 354$ $3.06 = C_2 \cdot 354$ $C_2 = \frac{3.06}{354}$ $1083.24 = 125216 C_1 + 1125.76 = 144256 C_1$ $- 42.52 = 18940 C_1$ $C_1 = \frac{3.06 - 354 \times .00224}{32}$ $C_1 = .071$	$C_0 = 0$ $.28 = C_1 \cdot 4 + C_2 \cdot 8$ $2.40 = C_1 \cdot 25 + C_2 \cdot 125$ $8.20 = C_1 \cdot 100 + C_2 \cdot 1000$ $24.30 = C_1 \cdot 225 + C_2 \cdot 3375$ <hr style="border: 0.5px solid black;"/> $35.18 = C_1 \cdot 354 + C_2 \cdot 4508$ $35.18 = C_2 \cdot 4508$ $C_2 = \frac{35.18}{4508}$ $C_2 = .00224$ $18940$ $3.06 = .70296 + 2.267$ <hr style="border: 0.5px solid black;"/> $32$ $32$ $H = .071t + .00224 t^2$
---	---

T	0	2	5	10	15	20
H	0	.15	.411	.934	1.57	2.31

$$\frac{dH}{dt} = 0.71 - .00448 t$$

$$\frac{dH}{dt} = .971$$

Ejemplo de un ajuste hiperbólico. Gráfica No. 4

5 10

T	0	2	7.5	15	20
H	0	.61	1.42	2.06	2.40
H	0	1.12	1.66	2.09	2.38

Experimentación

Teórico

$$1) \frac{.61 - 0}{2 - 0} = \frac{0 - 0}{0 - t} \quad H = .305 t = H$$

$$2) \frac{1.42 - .61}{7.5 - 2} = \frac{.61 - .61}{2 - t} \quad ; \quad \frac{.81}{5.5} = \frac{.61 - H}{2 - t} \quad ; \quad .147 = \frac{.61 - H}{2 - t}$$

$$.294 = .147 t = .61 - H$$

$$3) \frac{2.06 - 1.42}{15 - 7.5} = \frac{1.42 - H}{7.5 - t} \quad ; \quad \frac{.64}{7.5} = \frac{1.42 - H}{7.5 - t}$$

$$.0855 = \frac{1.42 - H}{7.5 - t} \quad ; \quad .64 - .0855 t = 1.42 - H$$

$$4) \frac{2.06 - 0}{15 - 0} = \frac{0 - 0}{0 - t} \quad H = 2.06 - H \quad .137 t = H$$

$$1) H = .305 t + 0$$

$$2) H = .147 t + .316 = 0$$

$$3) H = .0855 t + .78 = 0$$

$$4) H = .137 t + 0$$

$$H = .304 t$$

$$H^2 = .0855 H t + .78 H$$

$$= .3050 H t + .026 t^2 = .238 t$$

$$H = .3905 H t + .78 H + .026 t^2 + .238 t$$

$$H = .147 t + .316$$

$$H = .137 t$$

$$H = .147 H t + .316 H$$

$$= .137 H t + .02014 t^2 + .0433 t$$

$$H = .284 H t + .316 H + .02014 t^2 + .0433 t$$

$$u_1 u_3 = H^2 = .3905 H t + .78 H + .026 t^2 + .238 t$$

$$u_2 u_4 = H^2 = .284 H t + .316 H + .02014 t^2 + .0433 t$$

$$2.4^2 = .3905 (2.4) (20) + .78 (2.4) + .026 (100) + .238 (20)$$

$$5.76 = 18.7 + 1.87 + 10.4 + 4.76$$

$$5.76 + 10.40 + 4.76 = 20.92 \quad u_1 u_3 = .35$$

$$18.7 + 1.87 = \frac{-20.57}{.35}$$

$$2.4^2 = .284 (2.4) (20) + .316 (2.4) + .02014 (400) + .0433 (20)$$

$$5.76 + 8.056 + .866 = 14.682 \quad u_2 u_4 = .322$$

$$13.6 + .76 = \frac{14.360}{.322}$$

$$.35 = k \cdot .322 = 0 \quad k = \frac{.35}{.322} = 1.086$$

$$H^2 = .3905 H t + .78 H + .0260 t^2 + .238 t$$

$$= 1.086 H^2 + .3085 H t + .344 H + .0219 t^2 + .047 t$$

$$= .086 H^2 + .082 H t + .436 H + .0041 t^2 + .191 t$$

$$H^2 = H (.954 t + 5.07) + .0477 t^2 + 2.22 t = 0$$

$$H = \frac{.954 t + 5.07 \pm \sqrt{.909 t^2 + 9.66 t + 25.6} + .1908 t^2 + 8.88 t}{2}$$

$$H^2 = .954 H t + 5.07 H + .0477 t^2 + 2.22 t = 0$$

$$H = \frac{.477 t + 2.535 \pm \sqrt{.2749 t^2 + 4.635 t + 6.4}}{2}$$

Pendiente en el origen

$$2 H dH = .954 H dt + .954 t dH + 5.07 dH + .0954 t dt + 2.22 dt = 0$$

$$dH (2H) = .954 t + 5.07 + dt (.954 H + .9954 t + 2.22) = 0$$

$$dH = \frac{.954 H + .9954 t + 2.22}{2H} dt = \frac{.954 H + .9954 t + 2.22}{2H} dt = 2.438$$

$$dt = \frac{2H}{.954 H + .9954 t + 2.22} dH = \frac{2H}{.954 H + .9954 t + 2.22} dH = 5.07$$

$$\frac{dH}{dt} = 2.438$$

Por los métodos indicados se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

ECUACION DE LA GRAFICA No. 2 (AJUSTE parabólico)

Concentración de la fosfatasa a 100%

Substrato fosfato disódico pH inicial 8.2

Ecuación No. 2  $H = .3472 t - .01235 t^2$

ECUACION DE LA GRAFICA No. 3 (Ajuste parabólico)

Concentración de la fosfatasa a 100%

Substrato fosfato disódico pH inicial 8.5

Ecuación No. 3  $H = .071 t - .00224 t^2$

ECUACION DE LA GRAFICA No. 4 (Ajuste cónico)

Substrato fosfato disódico pH inicial 8.8

Ecuación No. 4  $H = .477 t - 2.535 \sqrt{.2749 t^2 + 4.635 t + .64}$

ECUACION DE LA GRAFICA No. 5 (Ajuste parabólico)

Substrato fosfato disódico pH inicial 9.1

Ecuación No. 5  $H = .0728 t - .0026 t^2$

La velocidad en el origen es la derivada de cada una de las anteriores ecuaciones, cuando  $t = 0$ .

$$\text{Para un pH 8.2 pendiente } \frac{dH}{dt} = .3472$$

$$\text{Para un pH 8.5 pendiente } \frac{dH}{dt} = .071$$

$$\text{Para un pH 8.8 pendiente } \frac{dH}{dt} = .438$$

$$\text{Para un pH 9.1 pendiente } \frac{dH}{dt} = .0728$$

(Ver Tabla I y Gráfica I - 1)

Para obtener las gráficas 2, 3, 4 y 5 correspondientes a la formación de ión hidrógeno contra tiempo, y para una concentración de fosfatasa 100% se tomó en el origen, o sea, a tiempo cero la concentración de ión  $H \times 10^6 = 0$  y a partir de este punto se calcularon las cantidades de ión hidrógeno formado tanto en el intervalo del tiempo como el ión hidrógeno total, resultando así la table I A

(Ver tabla I-A y Gráficas I-A-1, I-A-2, I-A 3 y I-A-4)

T A B L A N o . 1

Concentración relativa de fosfatasa		100%		60%		20%	
Concentración PO <sub>4</sub> m.mol lt.		13.12		39.5		65.58	
Tiempo en minutos	0	8.2	6.3	8.2	6.3	8.2	6.3
	2	8.15	7.09	8.15	7.08		
	5	8.10	7.95	8.11	7.75	8.16	6.3
	10	8.08	8.31	8.10	7.95	8.15	7.0
	15	8.07	8.52	8.08	8.3		
	20	8.07	8.52	8.08	8.52		
			pH	C x 10 <sup>9</sup> H	pH	C x 10 <sup>9</sup> H	pH

82

Concentración de promedio de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Sol.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7 g

Temperatura 38° C.

60%		20%		100%		60%		20%		100%		60%		20%		100%	
39.5		65.58		13.12		39.5		65.58		13.12		39.5		65.58		13.12	
6.3	8.2	6.3	8.5	3.16	8.5	3.1	8.52	3.06	8.80	1.58	8.8	1.58	8.8	1.58	9.1	.795	9.
7.08			8.48	3.3	8.49	3.2	8.51	3.10	8.86	2.19	8.69	2.04	8.73	1.78	9	1.0	9.
7.75	8.16	6.92	8.41	3.61	8.47	3.4	8.51	3.10	8.56	2.76	8.59	2.57	8.73	1.86	8.96	1.4	8.
7.95	8.15	7.08	8.40	3.98	8.44	3.6	8.50	3.16	8.49	3.24	8.57	2.70	8.73	1.86	8.94	1.15	8.
8.4			8.32	4.78	8.42	3.8	8.50	3.16	8.44	3.64	8.53	2.96	8.72	1.91	8.9	1.26	8.
8.52			8.30	5	8.41	3.9	8.49	3.24	8.40	3.98	8.51	3.09	8.71	1.95	8.89	1.29	8.
$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH

24

25

25

en de promedio de datos empleando como abstrato:

$$4PO_{4.7} \text{ a } q \quad 200 \quad .0787 \frac{\text{m} \text{ nol.}}{\text{ml.}}$$

39° C.

T A B L A N o . 1

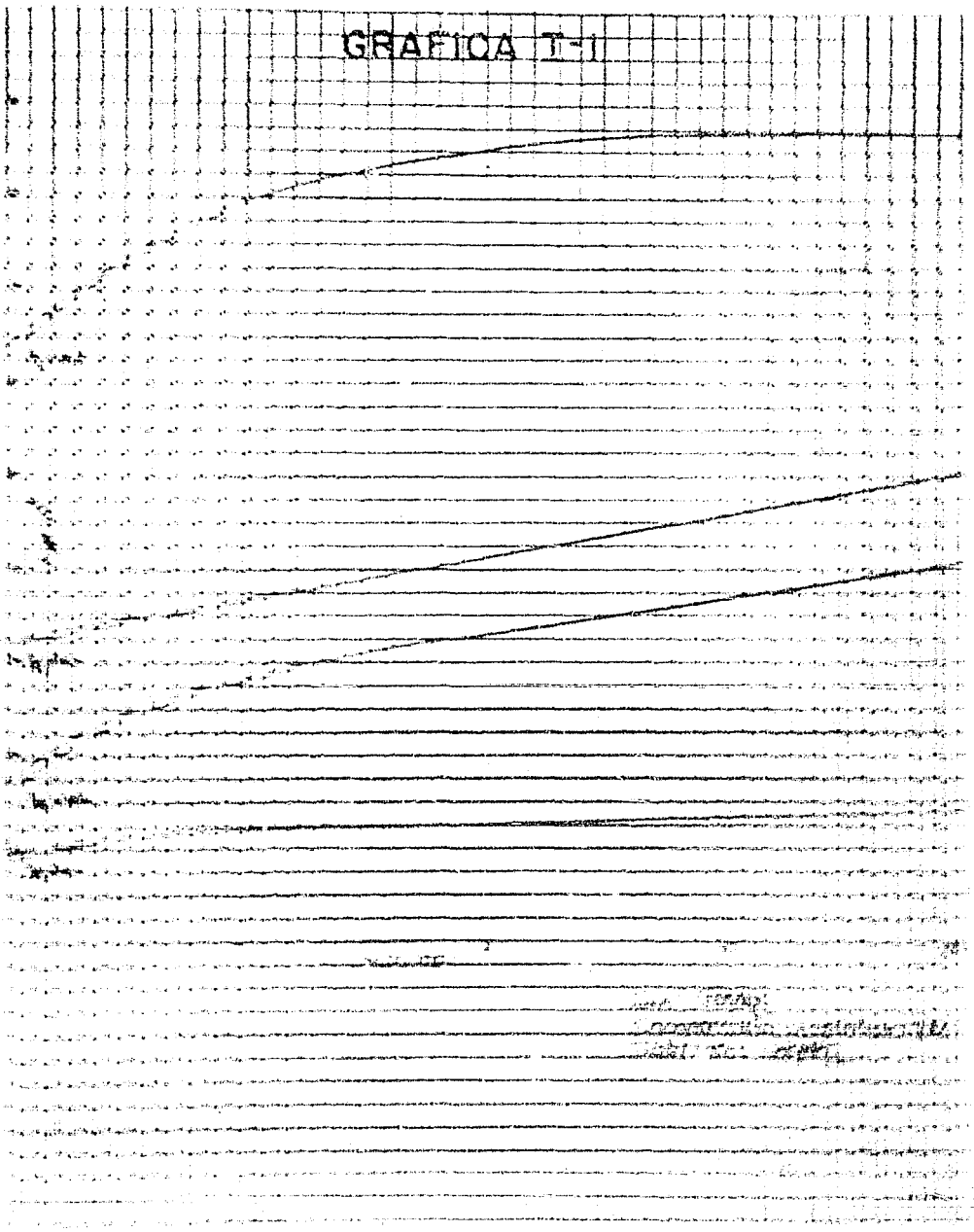
	20%		100%		60%		20%		100%		60%		20%	
	65,58		13,12		39,5		65,58		13,12		39,5		65,58	
3.1	8,52	3,06	8,80	1,58	8,8	1,58	8,8	1,58	9,1	,795	9,1	,795	9,1	,795
3.2	8,51	3,10	8,66	2,19	8,69	2,04	8,75	1,78	9	1,0	9,01	,98	9,1	,795
3.4	8,51	3,10	8,56	2,76	8,59	2,57	8,73	1,86	8,96	1,1	8,98	1,05	9,09	,81
3.6	8,50	3,16	8,49	3,24	8,57	2,70	8,73	1,86	8,94	1,15	8,95	1,12	9,06	,87
3.5	8,50	3,16	8,44	3,64	8,53	2,96	8,72	1,91	8,9	1,26	8,92	1,2	9,03	,87
3.9	8,49	3,24	8,40	3,98	8,51	3,09	8,71	1,95	8,89	1,29	8,95	1,12	9,07	,85
$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H

2,5

2,5

9,1

# GRAFICA I-1





# ESTUDIO ION $H^+$ tiempo

Concentración fosfatasa 100%

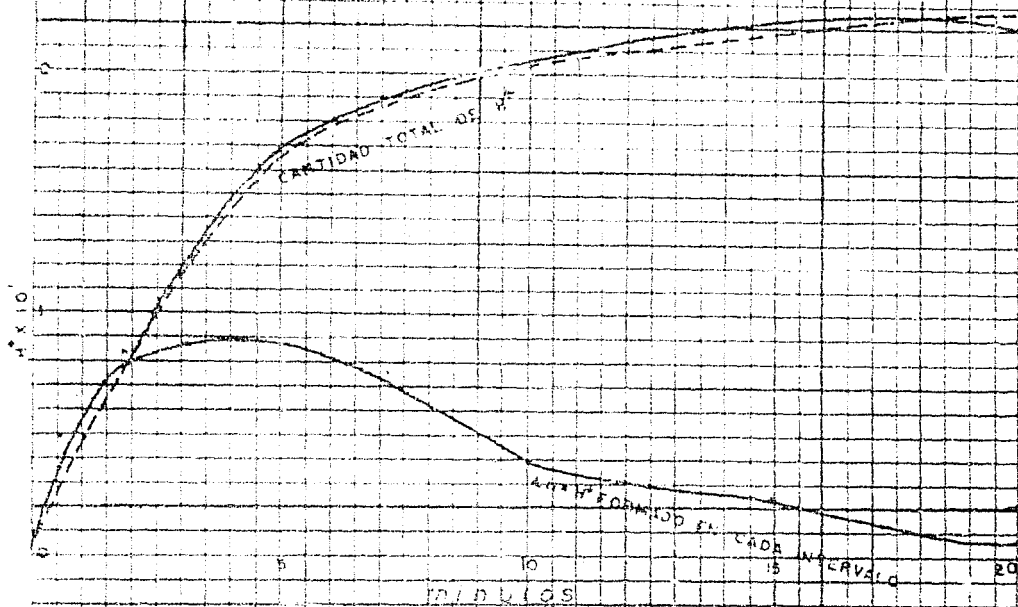
Tiempo transcurrido	0	2	5	10	15	20	Ph inicial 8,2
1. $\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo $\times 10^3$	0	.79	.85	.36	.21	0	
$H^+$ total formado $\times 10^3$	0	.79	1.65	2.01	2.22	2.22	
Valor teórico	0	.783	1.64	2.02	2.14	2.23	
2. $\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo $\times 10^3$	0	.14	.34	.34	.80	.22	Ph inicial 8,
$H^+$ total formado $\times 10^3$	0	.14	.48	.82	1.62	1.84	
Valor teórico	0	.14	.41	.63	1.58	2.30	
3. $\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo $\times 10^3$	0	.61	.57	.48	.40	.31	Ph inicial 8,5
$H^+$ total formado $\times 10^3$	0	.61	1.18	1.66	2.06	2.40	
Valor teórico	0	.611	1.13	1.67	2.09	2.38	
4. $\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo $\times 10^3$	0	.205	.40	.65	.11	.03	Ph inicial 9,1
$H^+$ total formado $\times 10^3$	0	.205	.605	.655	.665	.665	
Valor teórico	0						

TABLA No. 1-A

$H^+$  formado a diferentes ph

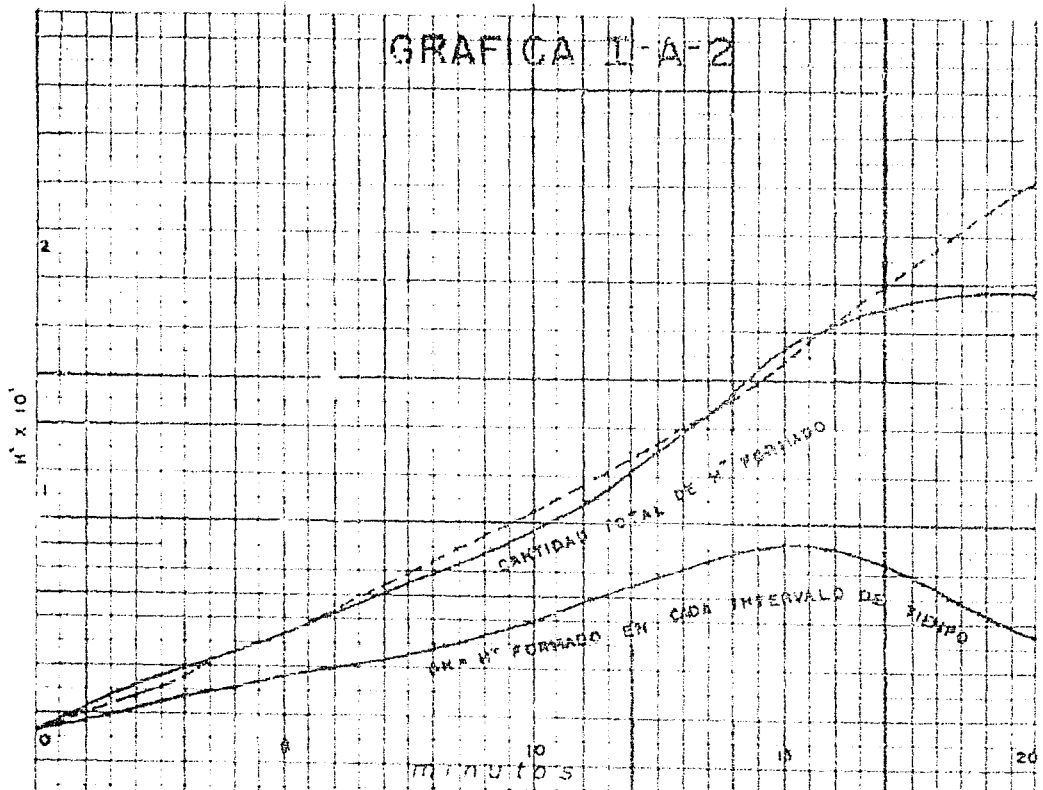
Substrato:  $Na_2HPO_4$

# GRAFICA I-A-1



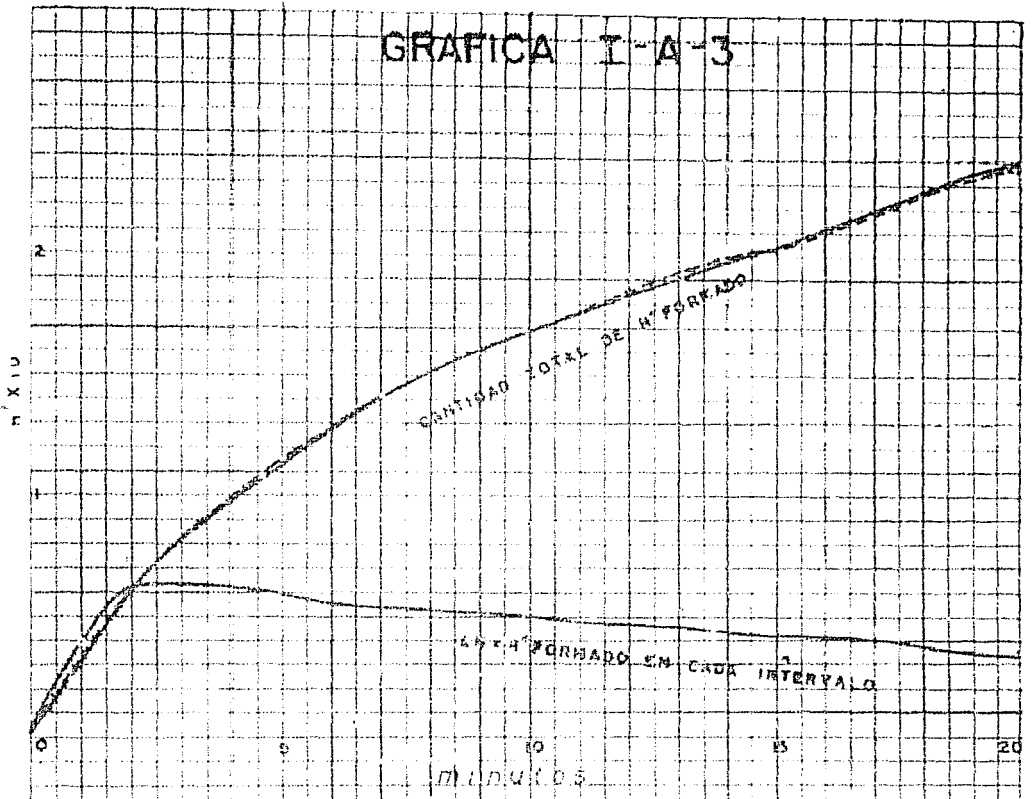
Q/tiempo  
 Aumento de concentración de H<sup>+</sup>  
 Concentración total de H<sup>+</sup> 100 %  
 Substrato Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 pH inicial: 8.2  
 • Ecuaciones:  
 $H = 0.524t - 0.044t^2 + 0.0502t^3 - 0.0075t^4$   
 $H = 0.209 + 0.0712t - 0.00737t^2 + 0.0015t^3$   
 $t_{max} = 4.90$   
 $H_{max} = 0.209$

# GRAFICA II-A-2



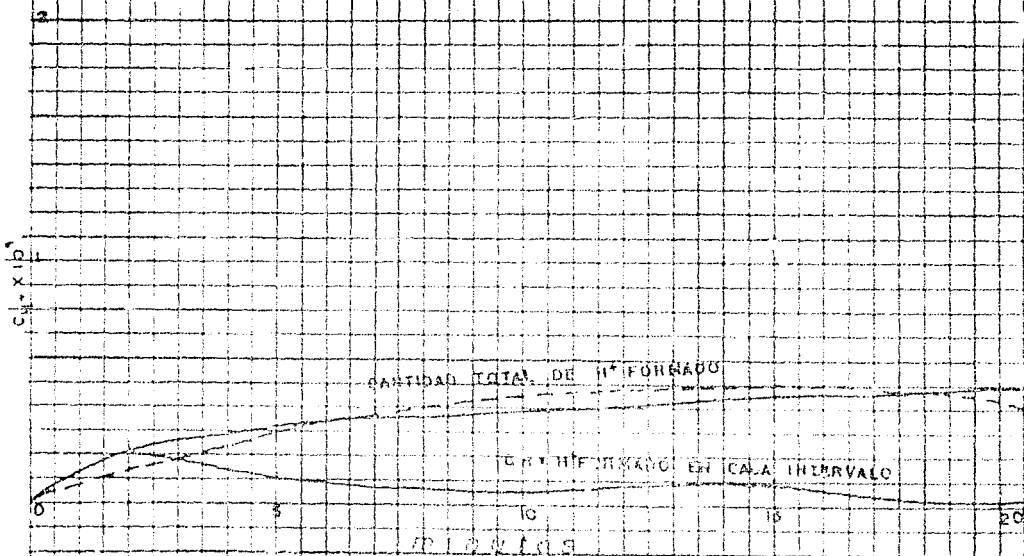
Curva de  
 Aumento de concentración de H<sup>+</sup>  
 Concentración fosfórica 100%  
 Substrato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 P. original 185  
 Ecuaciones:  
 $H_t = 0.11t + 0.022t^2$   
 $\frac{dH_t}{dt} = 0.24t$

# GRAFICA I-A-3



Concentración H<sub>2</sub> tiempo  
 Aumento de concentración de H<sub>2</sub>  
 Concentración fosfatos: 100%  
 Sustancia: Ac. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 P<sub>H</sub>: 80  
 Ecuaciones:  
~~H: 4771 - 2535 + 27101 - 16751 + 65~~  
~~H: 4771 - 2535 + 10710 - 16751 + 232~~  
 G.A. - 428

# GRAFICA I-A-4



Concentración H<sup>+</sup> Atómico  
 Aumento concentración H<sup>+</sup>  
 Concentración total en 100 s  
 Substrato: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 C = 0.1  
 Ediciones  
 N.º 1987 - 1988  
 B.O. 1986

La gráfica I - 2 se obtiene a partir de los datos de la Tabla I para una concentración de fosfatasa al 60%.

Se observa que sólo para el pH de 8.2 y 8.8 tienen las curvas suficiente regularidad, por eso sólo estas dos se calcularon matemáticamente.

(Ver gráfica I - 2)

(Ver Tabla I - B)

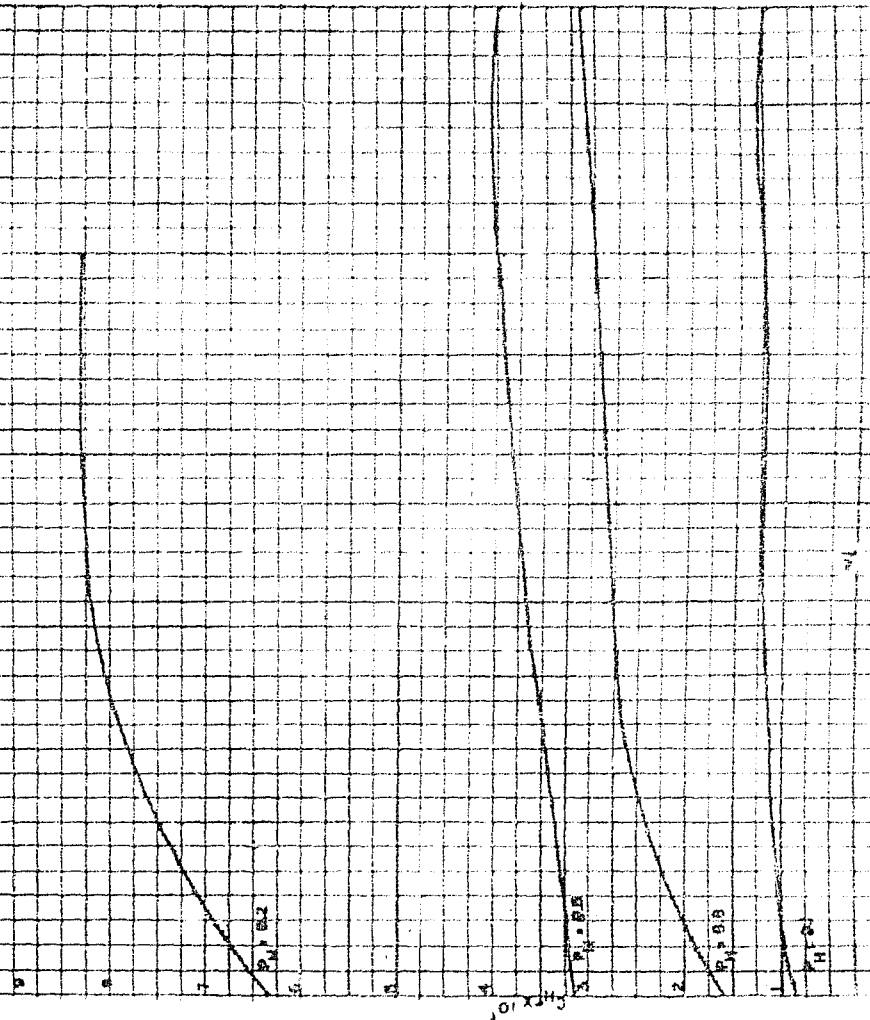
Las gráficas I - B - 1 y I - B-2 se obtienen a partir de la cantidad de ión hidrógeno formado según los datos de la tabla I-B.

En las dos gráficas se efectuó tanto el ajuste parabólico como el general cónico. El primero muestra una desviación relativamente grande de los valores experimentales. El segundo, ajusta casi exactamente para los valores experimentales, menos dentro de un intervalo de tiempo que en el caso del pH 8.2 va de 2.3 minutos a 4.9 minutos.

Para el pH de 8.8 el intervalo va de 3.39 minutos a 4.85 minutos. Los puntos experimentales presentan también una inflexión entre estos periodos, lo que parece indicar que hay una modificación en los factores de la velocidad de reacción.

(Ver gráficas I-B1 y I-B-2)

# GRAFICA I-2



CONCENTRACION DE HORMONAS  
CONCENTRACION DE LAS HORMONAS  
SUBSTRATO Y VOLUMEN

# ESTUDIO ION $H^+$ tiempo

Concentración fosfatasa 60%

1.	Tiempo transcurrido	0	2	5	10	15	20	
	$\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo x $10^9$	0	.78	.67	.20	.35	.22	Ph inicial 8.2
	$H^+$ total formado x $10^9$	0	.78	1.45	1.65	2.00	2.22	
	Valor teórico	0	.785	1.41	1.65	1.94	2.23	
2.	$\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo x $10^9$	0	.4	.2	.2	.2	.1	Ph inicial 8.5
	$H^+$ total formado x $10^9$	0	.4	.3	.5	.7	.8	
	Valor teórico							
3.	$\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo x $10^9$	0	.46	.53	.17	.26	.13	Ph inicial 8.8
	$H^+$ total formado x $10^9$	0	.46	.99	1.16	1.42	1.55	
	Valor teórico	0	.36	.8	1.30	1.50	1.40	
4.	$\Delta H^+$ $H^+$ formado en el intervalo x $10^9$	0	.085	.075	.07	.08	.08	Ph inicial 9.1
	$H^+$ total formado x $10^9$	0	.085	.160	.230	.35	.39	
	Valor teórico							

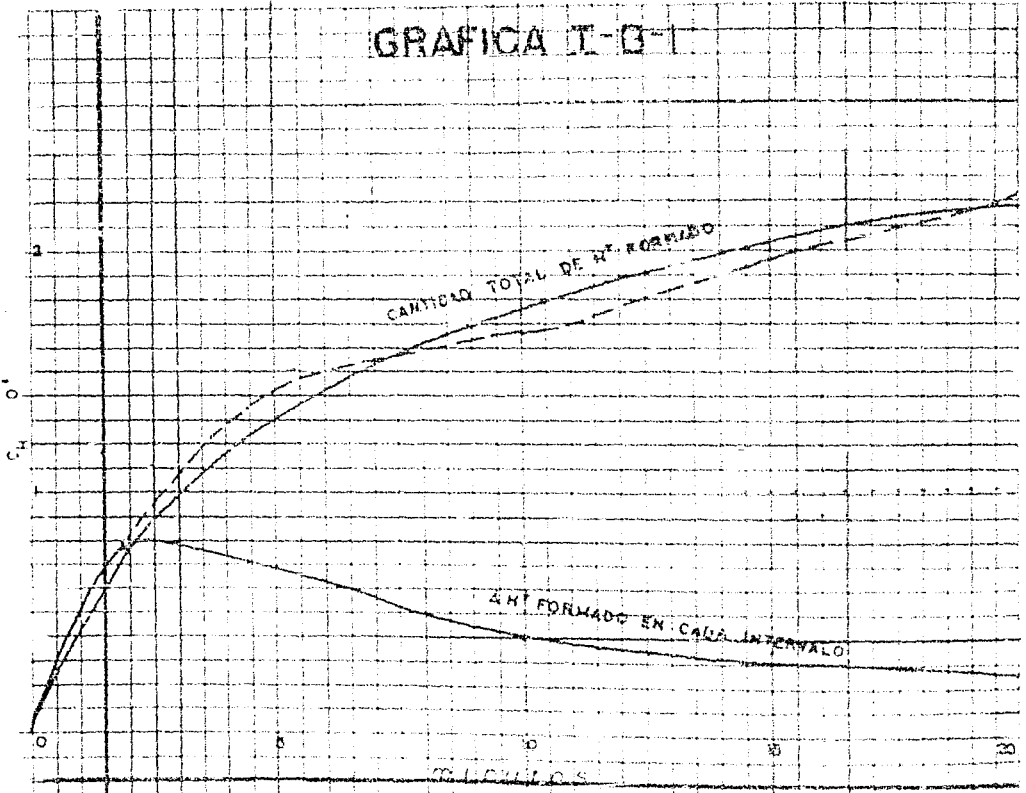
TABLA No. 1-B

$H^+$  formado a diferentes ph

Substrato:  $Na_2HPO_4$

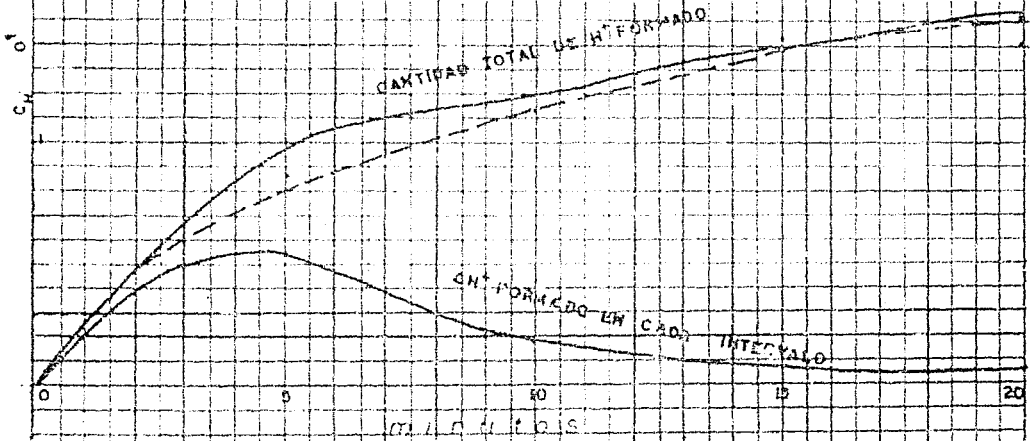


# GRAFICA I-B-1



Concentración H<sub>2</sub> máxima  
 Aumento concentración H<sub>2</sub>  
 Concentración Inicial H<sub>2</sub> 0.04  
 Substrato: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 P<sub>2</sub> 18.2  
 Ecuación:  
 H<sub>2</sub> 2.000 (18.2) = 17.13 : 1.13  
 dH = 1.572  
 dt

# GRAFICA I B-2



CANTIDAD DE H+ / TIEMPO  
 CANTIDAD DE H+ FORMADO: 60%  
 SUSTANCIA: NaHPO<sub>4</sub>  
 p = 9.3  
 W = 1.921 x 10<sup>-3</sup> g/mol  
 molaridad = 0.0001465  
 pH = 9.3  
 (a)

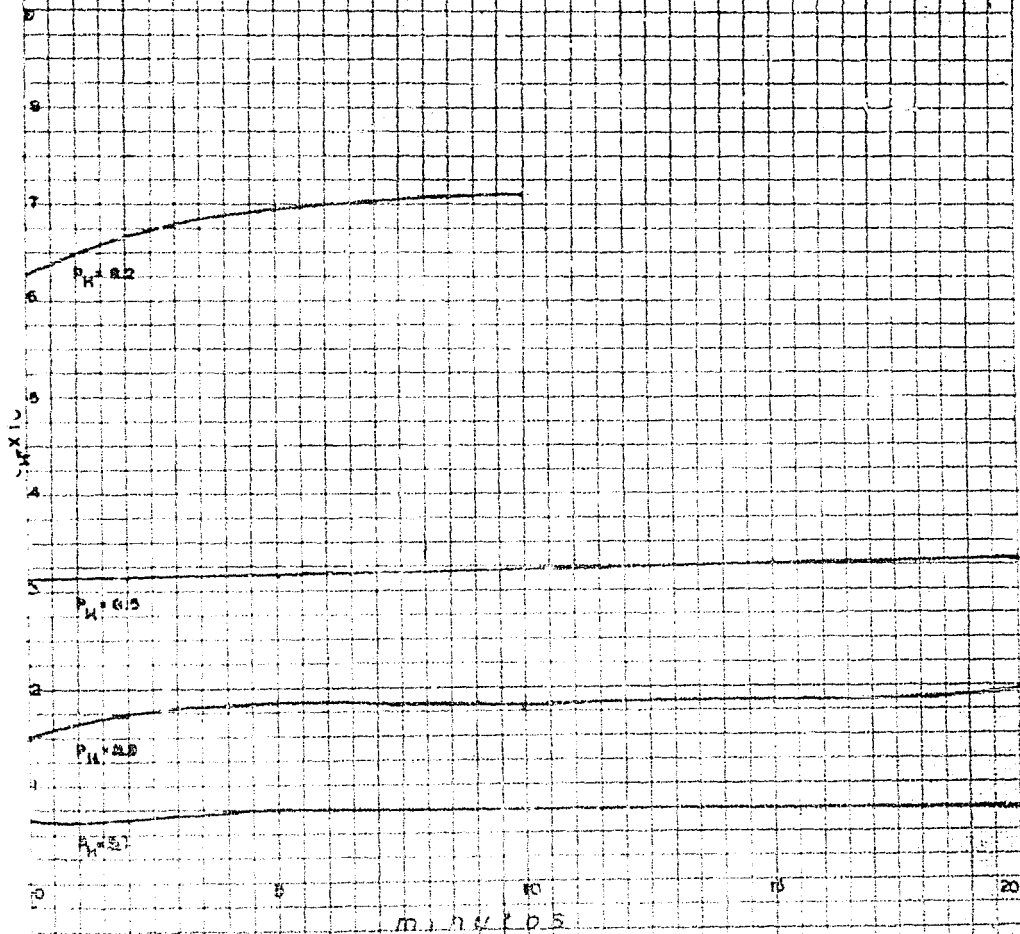
Ver Gráfica I-B-1 y I-B-2.

Gráfica I-3 obtenida a partir de los datos de la tabla 1, presenta regularidad únicamente para un pH de 8.2, esta curva fue la única que se ajustó con los datos de la tabla 1-C quedando como muestra la gráfica I-C-1. (Ver esta gráfica).

De las gráficas anteriores se deduce que existen dos pH; 8.2 y 8.8 a los cuales la reacción sigue una marcha regular. En la gráfica I-D-1 se comparan las curvas para un pH de 8.2 y concentraciones de fosfatasa de 100%, 60% y 20% y las curvas para un pH de 8.8 en concentraciones de fosfatasa de 100% y 60% en la gráfica I-D-2.

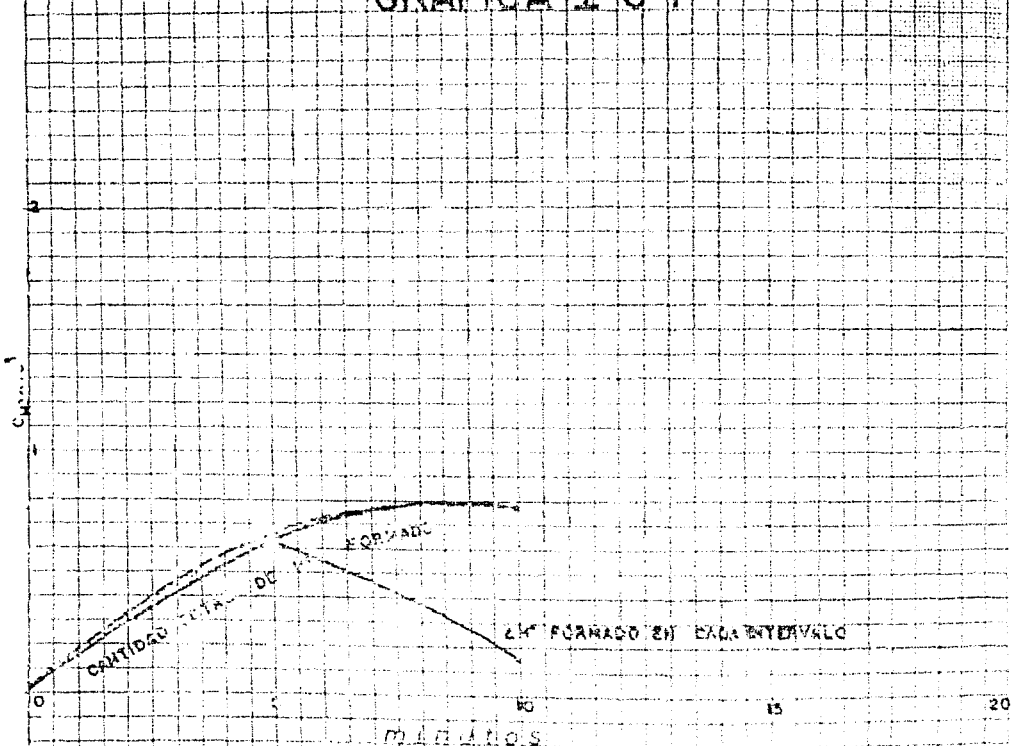
(Ver gráfica I-D-1 y I-D-2).

# GRAFICA I-3



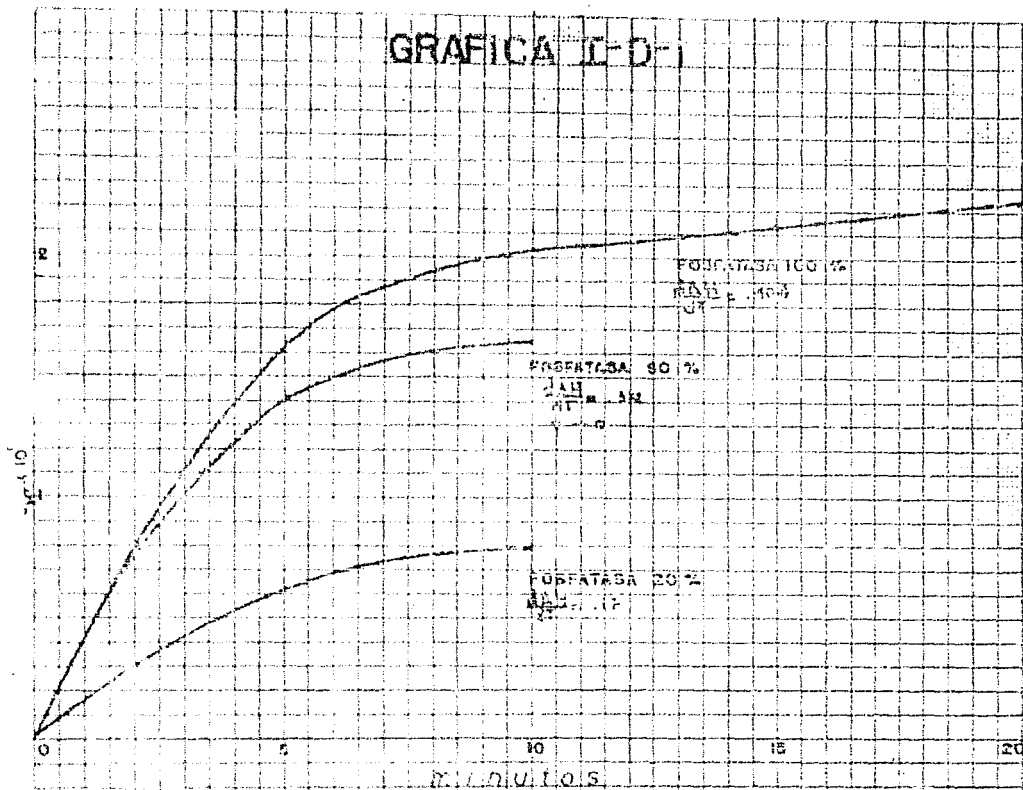
Concentración  $H^+$ /tiempo  
 Concentración fosfatasa 20%  
 Substrato:  $Na_2HPO_4$

# GRAFICA I-C-1



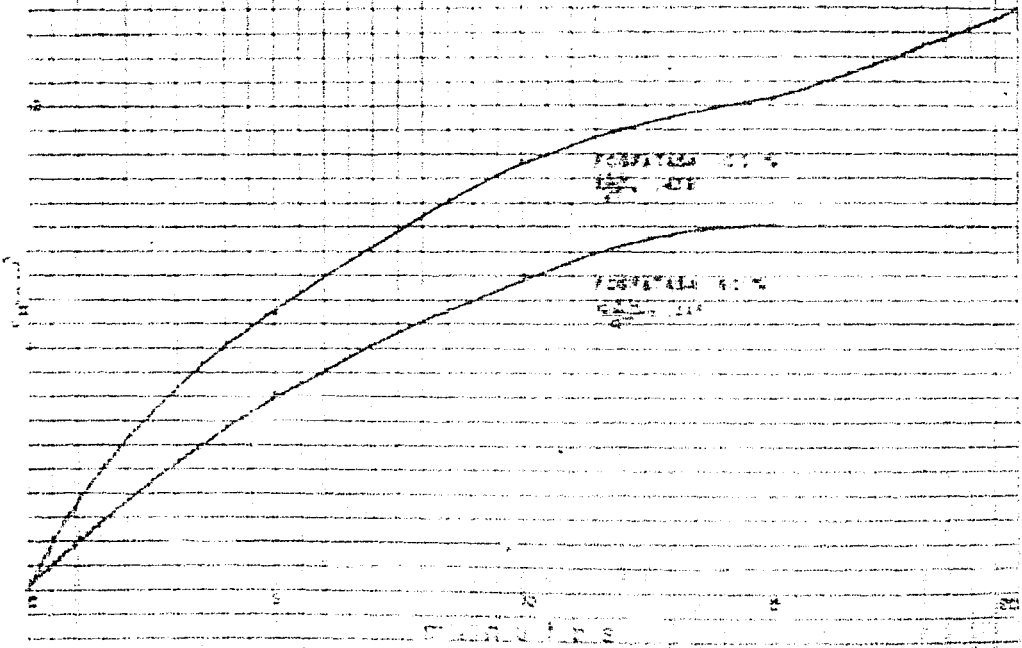
Concentración H<sub>2</sub>O tiempo  
 Concentración Fosfato 20%  
 Substrato Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 pH 8.0  
 Etapas  
 11.11-10000  
 11.11-10000  
 11.11-10000  
 11.11-10000  
 11.11-10000

# GRAFICA II-D-1



Comparación de curvas ajustadas  
 Substrato:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 $P_0 \text{ original} = 8.7$

# GRAFICA I-D-2



PROFUNDIDAD DE LA CUBIERTA  
PROFUNDIDAD DEL FONDO

## Substrato de Glicerofosfato (Ver Tabla II y gráfica II-1).

En la gráfica de concentración de fosfatasa de 100% y pH de 8.2 el ajuste hiperbólico sólo da valores arriba de los quince minutos y abajo de los dos minutos; por ésto, se prefirió el ajuste parabólico aunque, como se ve en la gráfica, sólo es aplicable a los primeros minutos.

(Ver Tabla II-A y gráficas II-A-1, II-A-2, y II-A-3).



T A B L A N o . 2

Concentración relativa de fosfatasa		100%		60%		20%		100%		
Concentración PO <sub>4</sub> m.mol·lt.		5.3		15.9		26.5		5.3		
	0	8.2	6.3	8.2	6.3	8.2	6.3	8.5	3.16	8.5
	0	8.12	7.6	8.12	7.6	8.2	6.3	8.41	3.9	8.5
	5	8.06	8.7	8.1	7.94	8.21	6.15	8.31	4.9	8.5
	10	8.01	9.8	8.05	8.9	8.21	6.15	8.28	5.25	8.5
	15	8.01	9.8	8.05	8.9	8.21	6.15	8.22	6	8.5
	20	8	10	8.01	9.8	8.21	6.15	8.2	6.3	8.5
	Tiempo en minutos	pH	$\frac{C}{H} \times 10^9$	pH	$\frac{C}{H} \times 10^9$	pH	$\frac{C}{H} \times 10^9$	pH	$\frac{C}{H} \times 10^9$	

8.2

Concentración de promedio de datos empleando como

Sol. glicerofosfato (5 1/2 H<sub>2</sub>O) 1%  $\frac{\text{m. mol.}}{\text{ml.}}$

Temperatura 38° C.

T A B L A N o . 2

T A B L A N o . 2

Elevación	100%		60%		20%		100%		60%		20%		100%		60%	
	5.3	15.9	26.5	5.3	15.9	26.5	5.3	15.9	26.5	5.3	15.9	26.5	5.3	15.9	26.5	
0	8.2	6.3	8.2	6.3	8.2	6.3	8.5	3.16	8.5	3.16	8.5	3.16	8.8	1.6	8.8	1.6
0	8.12	7.6	8.12	7.6	8.2	6.3	8.31	2.5	8.4	4	8.5	3.16	8.71	1.66	8.92	3.07
2	8.26	7.7	8.1	7.34	8.24	6.15	8.31	4.5	8.38	1.8	8.48	3.67	8.66	2.2	8.61	2.48
10	8.34	7.8	8.17	8.0	8.25	6.15	8.38	3.25	8.29	3.1	8.48	3.55	8.59	2.6	8.54	2.71
14	8.31	7.8	8.15	8.0	8.21	6.15	8.35	4	8.27	4	8.48	3.55	8.56	2.7	8.59	3.3
20	8.3	7.8	8.15	8.0	8.21	6.15	8.3	4.3	8.2	3.0	8.47	3.65	8.53	2.7	8.48	3.46

Concentración de proteínas de cultivos empobrecidos como se describe:

Sol. glicerofosfato 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 7.0

Temperatura 38° C

T A B L A N o . 2

20%		100%		60%		20%		100%		60%		20%	
26.5		5.3		15.9		26.5		5.3		15.9		26.5	
pH	6.3	8.5	3.16	8.5	3.16	8.5	3.16	8.8	1.6	8.8	1.6	8.8	1.6
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>	6.3	8.41	3.9	8.4	4	8.5	3.16	8.71	1.95	8.69	2.05	8.77	1.7
pH	6.15	8.31	4.9	8.32	4.8	8.48	5.65	8.65	2.2	8.61	2.45	8.73	1.9
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>	6.15	8.28	5.25	8.29	5.1	8.48	5.65	8.59	2.6	8.54	2.9	8.71	1.95
pH	6.15	8.22	6	8.22	6	8.48	5.65	8.54	2.9	8.49	3.2	8.71	1.95
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>	6.15	8.2	6.3	8.2	6.3	8.47	5.66	8.49	3.2	8.46	3.46	8.69	2.05
pH													
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>													
pH													
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>													
pH													
$C \times 10^9$ <sub>H</sub>													

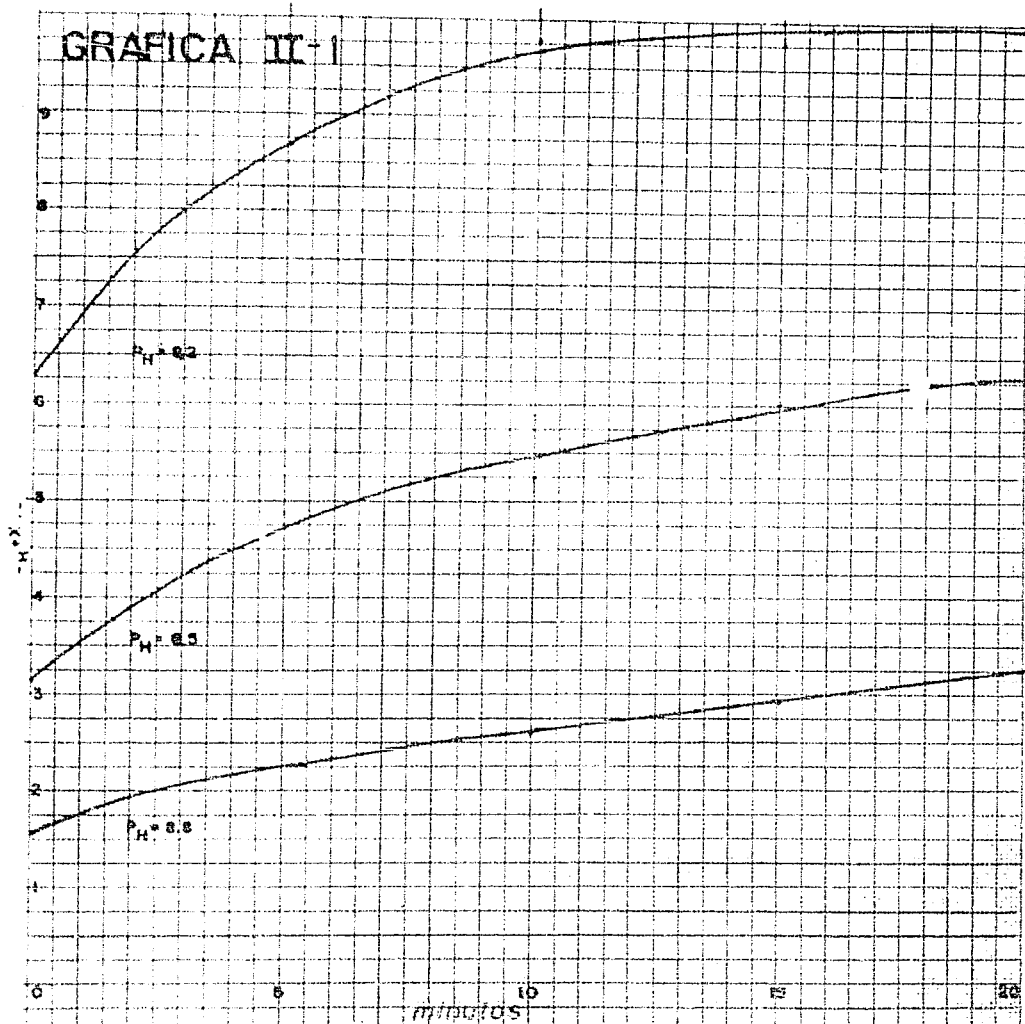
8.5

8.8

lio de datos empleando como sustrato:

2 H<sub>2</sub>O) 1% m. mol. 0.018 ml.

# GRAFICA II-1



Concentración H<sub>2</sub>O tiempo  
Aumento concentración H<sup>+</sup>  
Concentración fosfatasa 100%  
Substrato sólido glicerofosfato

# ESTUDIO ION $H^+$ tiempo

Concentración fosfatasa 100%.

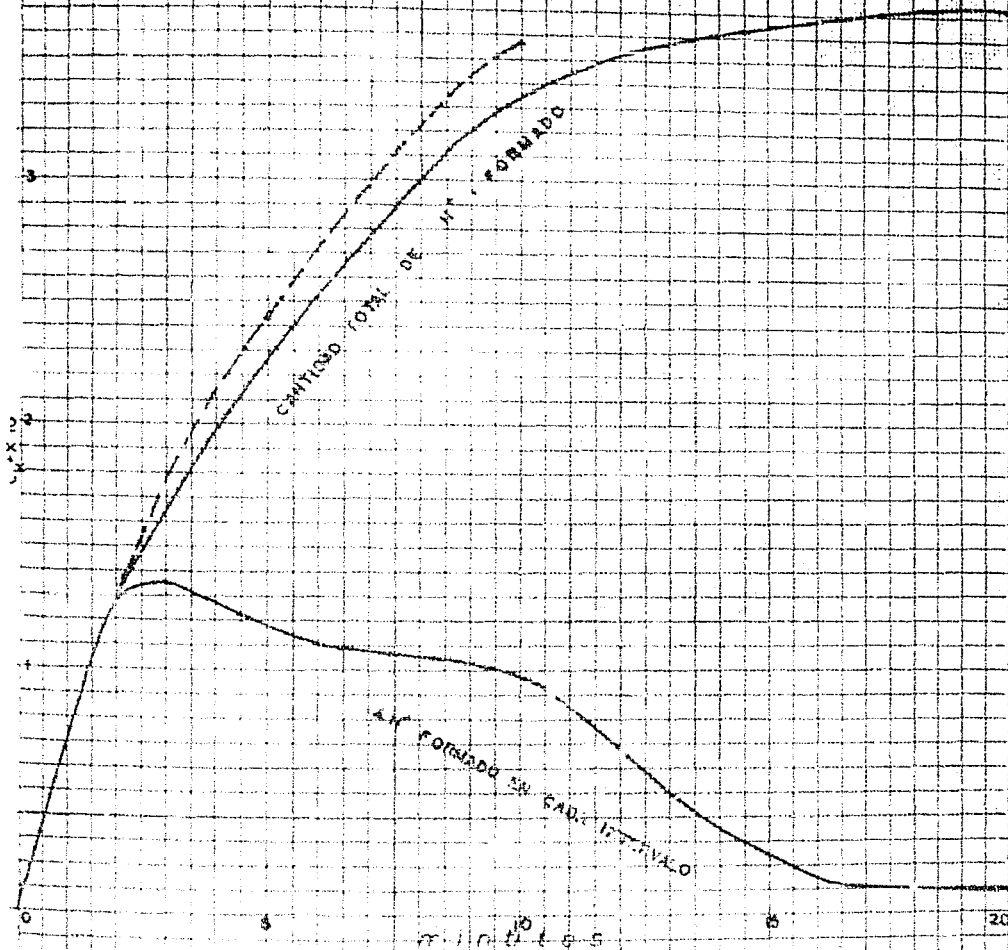
Tiempo transcurrido	t	0	2	5	10	15	20
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$		0	0.513	1.1	1.1	0	2
$H^+$ total formado $\times 10^6$		0	1.3	2.4	3.5	3.5	5.7
Valor teórico		0	1.21	2.11	3.51	1	3.98
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$		0	0.4	1	1.55	2.5	3.60
$H^+$ total formado $\times 10^6$		0	0.4	1.4	2.95	2.84	3.14
Valor teórico		0	0.33	1.17	2.07	2.57	3.08
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$		0	0.35	0.5	1.0	1.30	1.50
$H^+$ total formado $\times 10^6$		0	0.35	0.9	1.99	1.30	1.50
Valor teórico		0	0.3	0.67	0.9		
							Ph inicial 8.5
							Ph inicial 8.5

TABLA No. I. A

$H^+$  formado a diferentes pH

Substrato: Glicerosfato

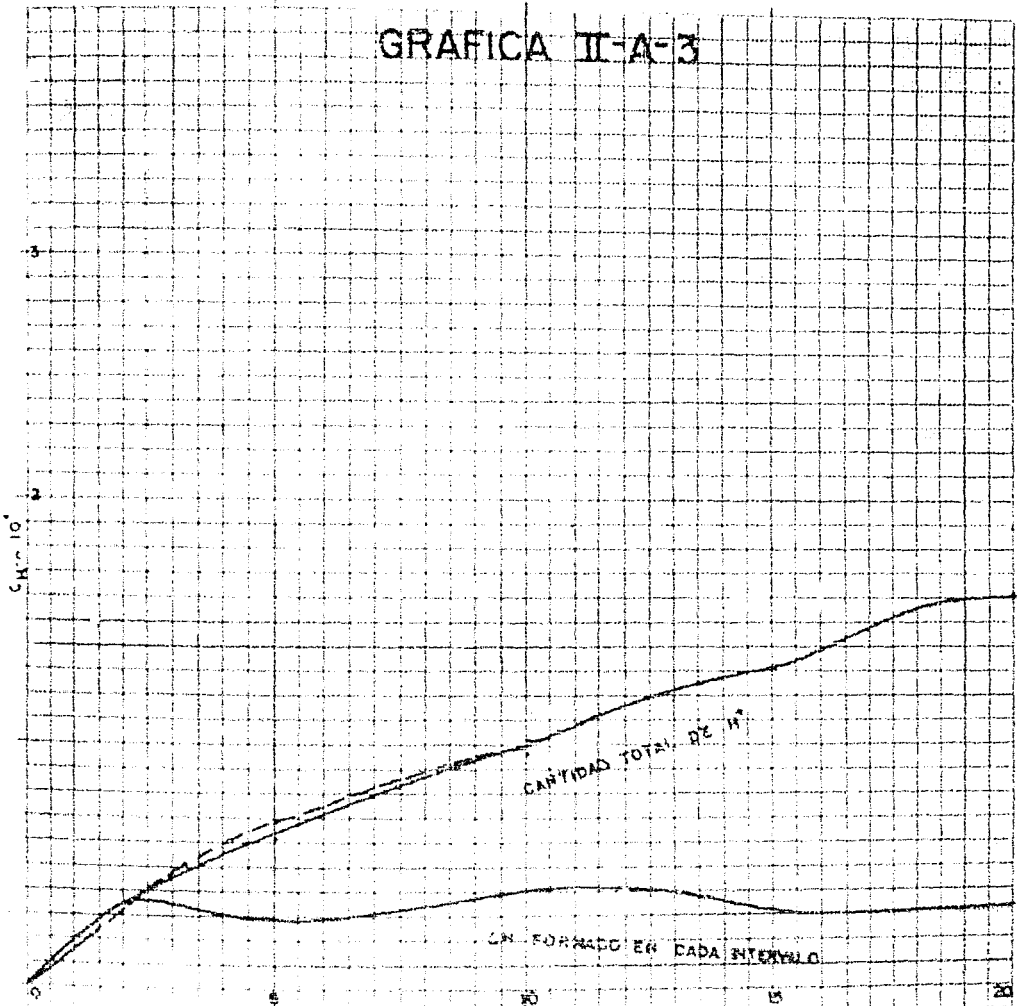
# GRAFICA I-A-1



Con extracción H<sup>+</sup> tiempo  
 Aumento de concentración H<sup>+</sup>  
 Concentración fosfatos 100%  
 Substrato: solución de cicero fosfato  
 pH 6.2  
 Ecuaciones:  
 $H^+ = 0.5H^+ + 1.75 \times 10^{-3} - 0.941 \times 0$   
 $H^+ = 0.5H^+ + 0.75 - 1.262 \times 10^{-3} + 0.35 \times t$   
 pH 6.2



# GRAFICA II-A-3

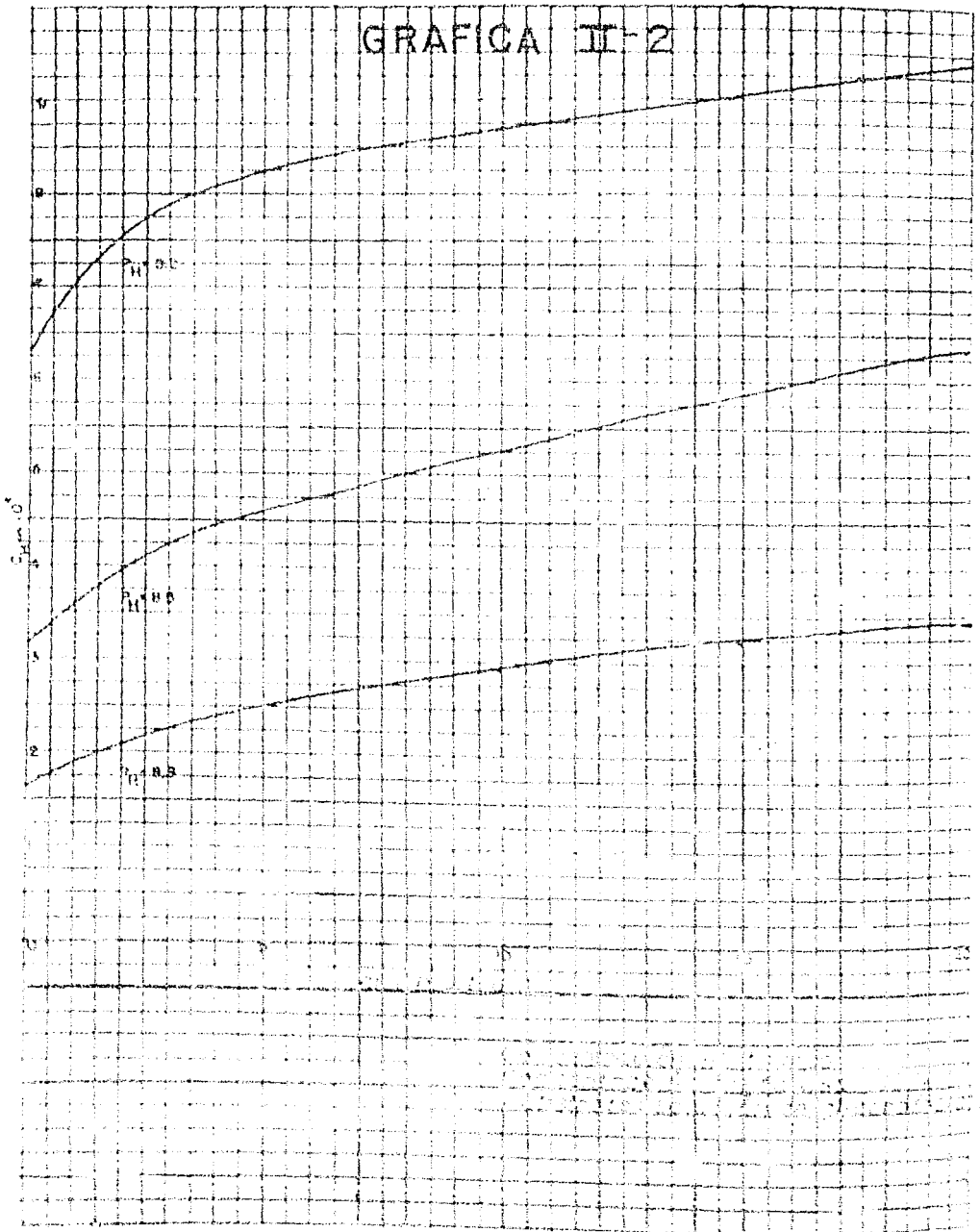


minutos

Concentración 97.1 mg/l  
 Avanzado de concentración H+  
 Concentración glicerato 0.1412  
 glicerato solución de glicerato  
 H+ 8.81  
 Formaciones:  
 H+ 1.65 x 10<sup>12</sup>  
 H+ 1.65  
 H+



# GRAFICA II-2



# ESTUDIO ION $H^+$ tiempo

Concentración fosfatasa 6977.

Tiempo transcurrido	0	2	5	10	15	20
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$	0	1.2	3.1	3.6	0	7.9
$H^+$ total formado $\times 10^6$	0	1.2	4.3	7.9	7.9	15.8
Valor teórico		.82	1.82	2.91	3.27	2.99
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$	0	.84	1.4	1.94	.90	3.0
$H^+$ total formado $\times 10^6$	0	.84	2.24	3.68	4.58	7.58
Valor teórico		.65	1.49	2.47	2.93	2.88
$\Delta H^+$ formado en el intervalo $\times 10^6$	0	.45	.40	.45	.30	.26
$H^+$ total formado $\times 10^6$	0	.45	.85	1.30	1.60	1.86
Valor teórico						

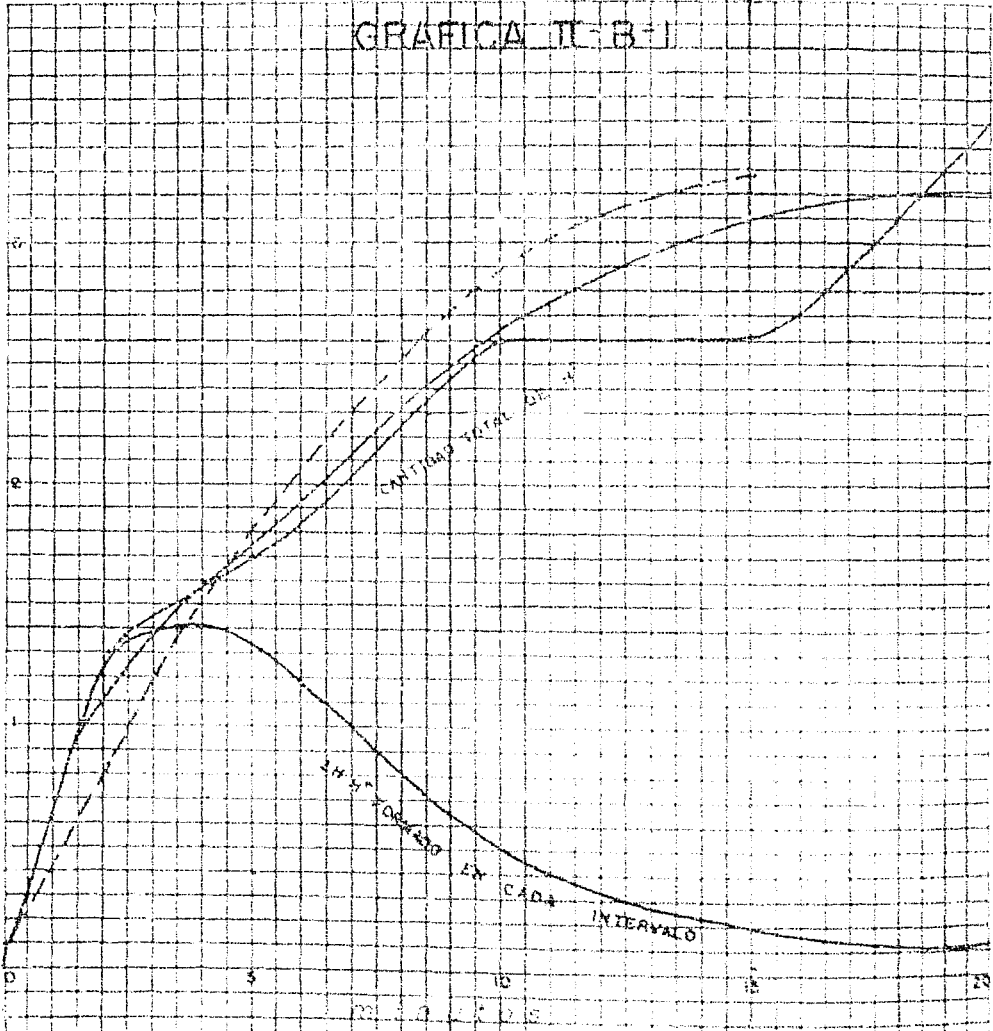
TABLA No. II-B

$H^+$  formado a diferentes ph

Substrato: Glicerofosfato

# GRAFICA II-B-1

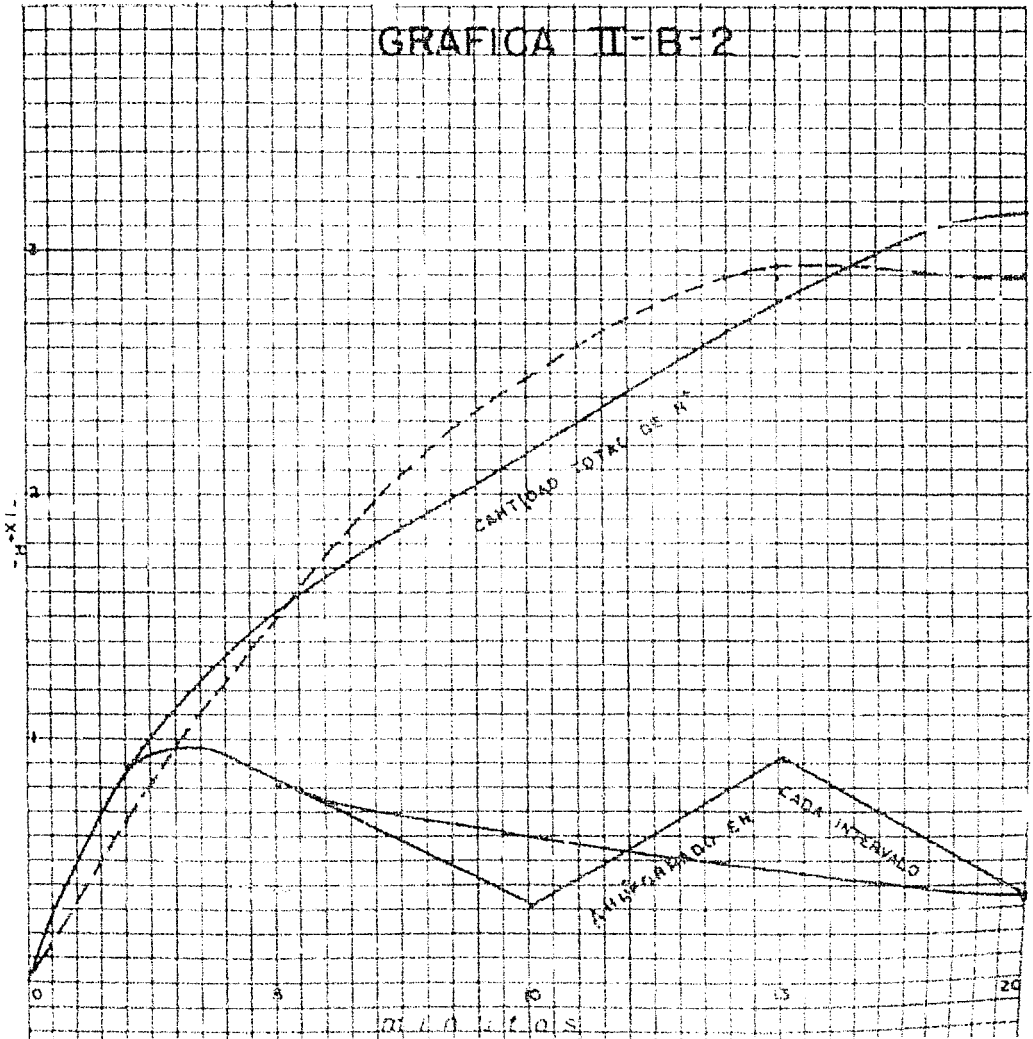
ATC



minutos

Concentración Hidrogeno  
 Concentración Oxigeno 61%  
 Substrato: solución de glucosa 320  
 0.168  
 1.437 1.438  
 1.14  
 1.1

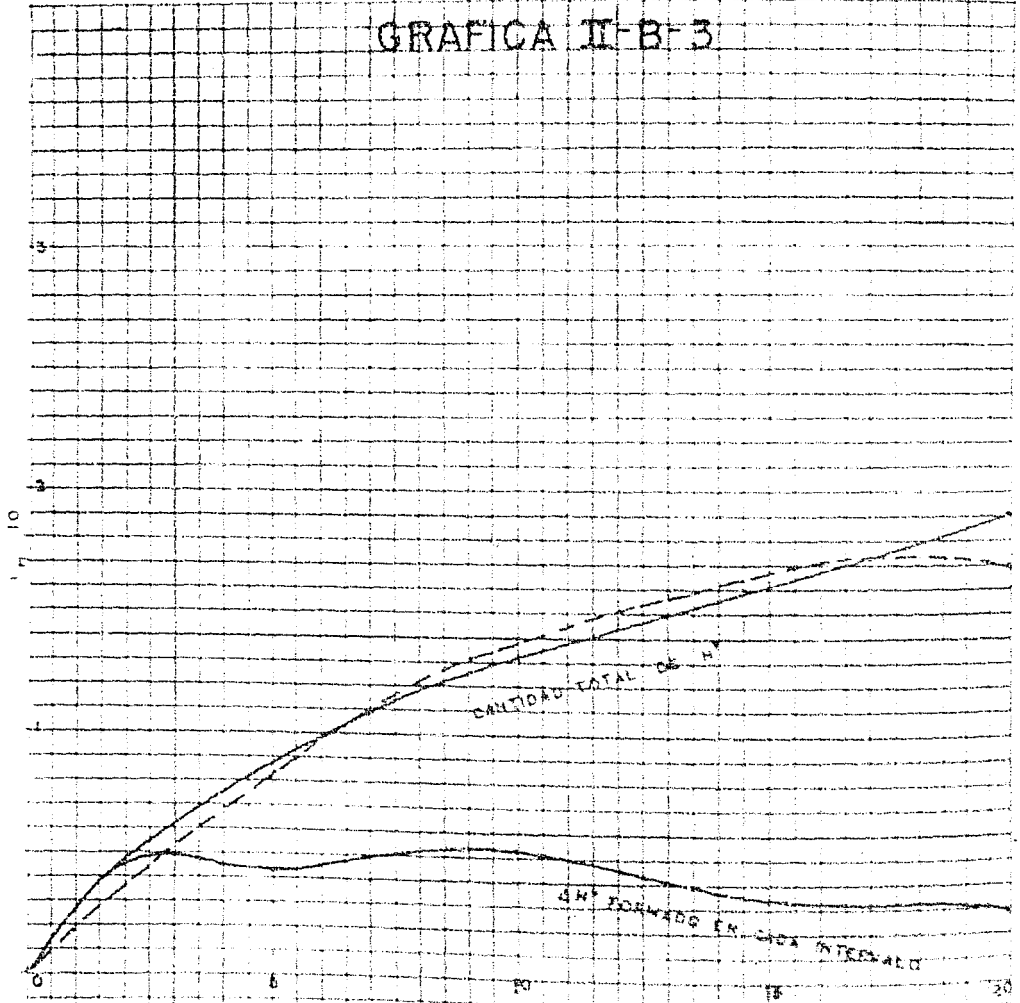
# GRAFICA II-B-2



DIEZ DÍAS

Concentración en el tiempo  
 Concentración atmosférica 50%  
 Sección de estudio para concentración  
 $D_1 = 0.5$   
 $F_0 = 0.000001$   
 $W = 0.000001$   
 $W_1 = 0.000001$   
 $W_2 = 0.000001$   
 CF

# GRAFICA II-B-3



TIEMPO EN HORAS

CANTIDAD TOTAL DE H<sub>2</sub>  
 H<sub>2</sub> FORWARD EN CADA INTERVALO  
 SUSPENDER EL SERVICIO EN CASO DE EMERGENCIAS  
 EN LOS CASOS DE EMERGENCIAS  
 EN LOS CASOS DE EMERGENCIAS  
 EN LOS CASOS DE EMERGENCIAS  
 EN LOS CASOS DE EMERGENCIAS  
 EN LOS CASOS DE EMERGENCIAS

(Ver gráficas II-B-1, II-B-2 y II-B-3)

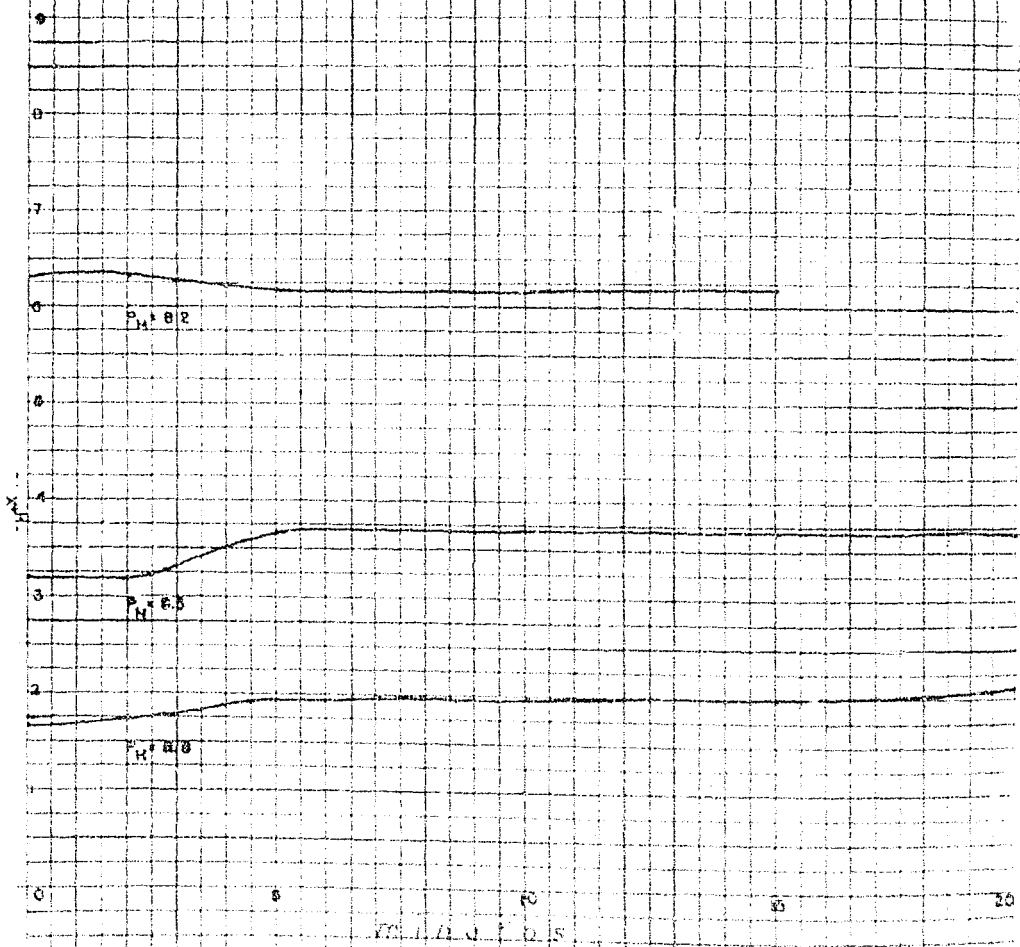
Como en el caso del fosfato disódico a un pH de 8.2 y concentración de fosfatasa a 20% las gráficas son completamente atípicas y por ésto ya no se sujetaron al análisis matemático.

(Ver gráfica II-3).

En las gráficas siguientes se muestran comparativamente la formación de iones hidrógeno para 100% y 60% de fosfatasa. Como se ve, únicamente a un pH de 8.2 hay una velocidad suficientemente diferenciada entre uno y otro porcentaje de fosfatasa.

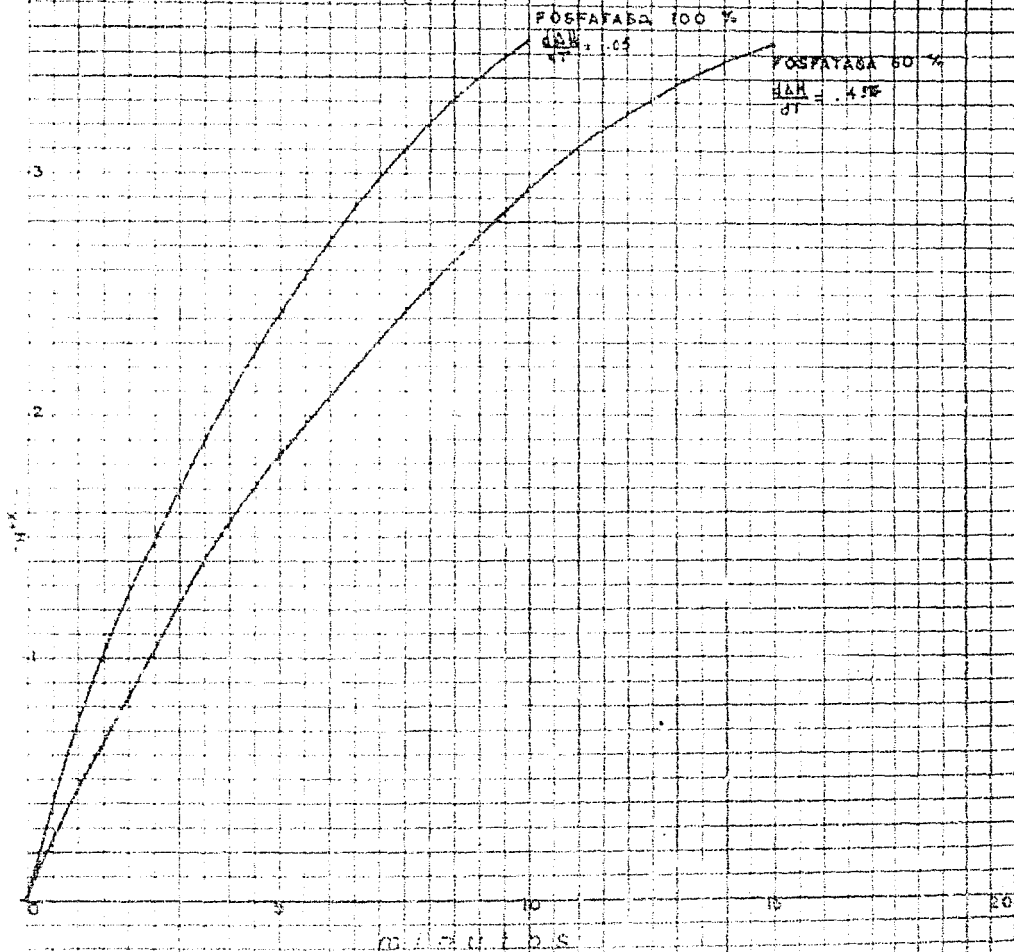
(Ver gráficas II-D-1, II-D-2 y II-D-3).

# GRAFICA II - 3



Concentración de HCl 0.1 M  
 Concentración de sacarosa 20 %  
 Constante de velocidad de difusión  $k = 1.5 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>

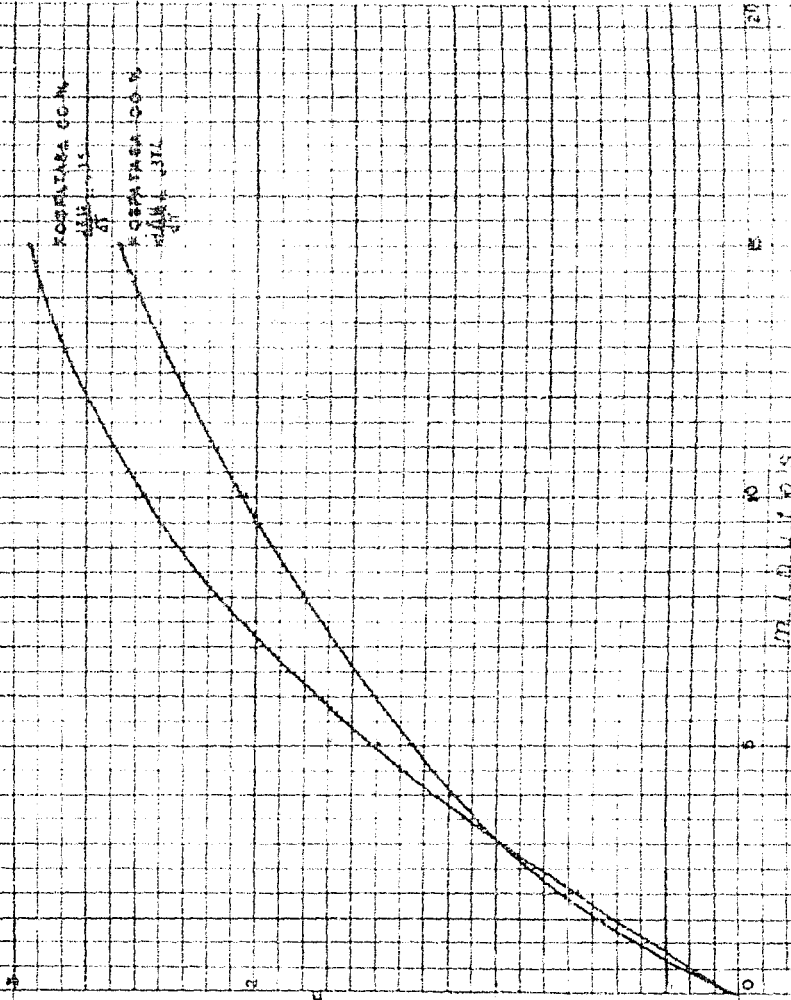
# GRAFICA II-D-1



Gráfica comparativa  
 Concentración Fosfatasa 100 por %  
 91-62

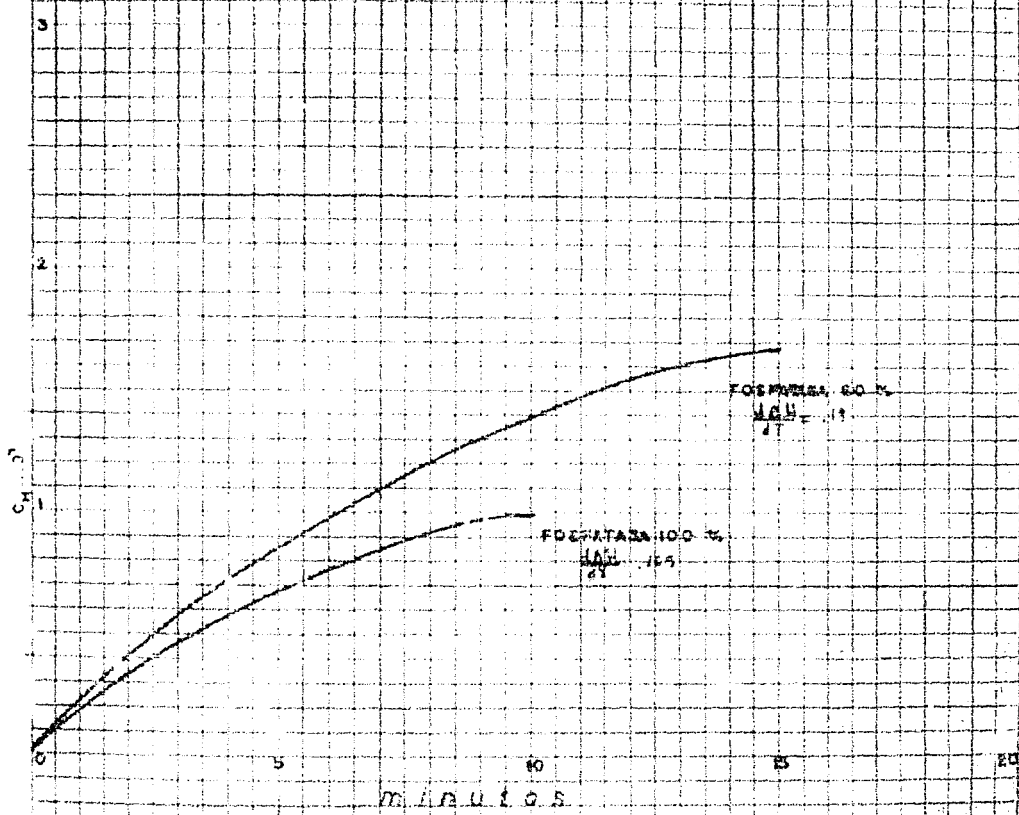


# GRAFICA D-D-2



GRUPO COMERCIAL DE  
CONCENTRACIONES GASOLAS 100, 80%  
P.V.

# GRAFICA II-D-3



Gráfica comparativa  
Concentración fosfórica 100 y 60%  
 $R_1 = 68$

## FOSFATO FENIL DISODICO. VERONAL.

Como se muestra en la tabla y gráficas siguientes, con excepción del 100% de fosfatasa y pH de 8.2, todas las demás curvas tienen muy pequeña pendiente por lo cual no se hizo el análisis matemático.

(Ver Tabla III y gráficas III-1, III-2 y III-3).

T A B L A N o . 3

Concentración relativa de fosfatasa		100%		60%		20%		100%		60%		
Concentración PO <sub>4</sub> m.mol lt.		.835		2.5		4.14		.835		2.5		
Tiempo en minutos	0	8.2	6.3	8.2	6.3	8.2	6.3	8.5	3.15	8.5	3.15	
	2	8.15	7.1	8.15	7.1	8.2	6.3	8.4	4	8.48	3.3	
	5	8.12	7.6	8.14	7.3	8.2	6.3	8.39	4.1	8.41	3.9	
	10	8.1	7.9	8.12	7.6	8.21	6.2	8.32	4.7	8.39	4.1	
	15	8.08	8.3	8.11	7.8	8.22	5.9	8.24	5.8	8.4	4	
	21	8.05	8.9	8.1	7.9	8.21	6.2	8.9	6.5	8.36	4.1	
			pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H
						8.2						
							8.5					

Concentración de promedio de datos empleando como sustrato:

Sol. fosfato-fenil sódico	fosfato fenil sódico	.545 gr.	m.
	Veronal	5.77	
	H <sub>2</sub> O l. m.	500 ml.	

Temperatura 38° C.

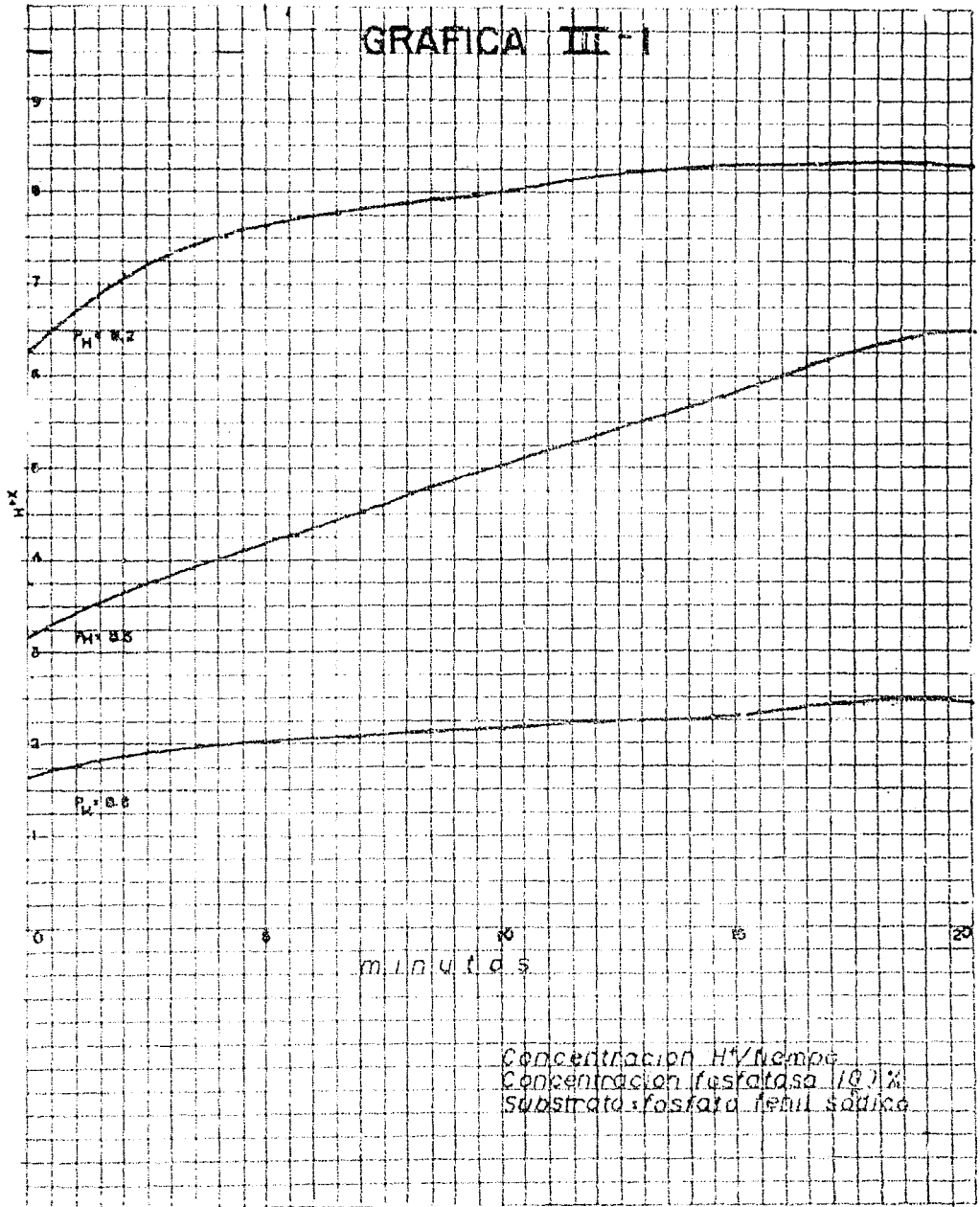
T A B L A N o . 3

20%	100%		60%		20%		100%		60%		20%	
4.14	.835		2.5		4.14		.835		2.5		4.14	
6.3	8.5	3.15	8.5	3.15	8.5	3.15	8.8	1.58	8.8	1.58	8.8	1.58
6.3	8.4	4	8.48	3.3	8.48	3.3	8.74	1.8	8.75	1.8	8.79	1.6
6.3	8.39	4.1	8.41	3.9	8.42	3.8	8.71	1.96	8.71	1.96	8.76	1.75
6.2	8.32	4.7	8.39	4.1	8.41	3.9	8.68	2.1	8.69	2.05	8.75	1.8
5.9	8.24	5.8	8.4	4	8.41	3.9	8.65	2.25	8.67	2.15	8.74	1.8
6.2	8.9	6.5	8.36	4.1	8.41	3.9	8.62	2.4	8.66	2.2	8.73	1.86
$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H	pH	$C \times 10^9$ H
85						88						

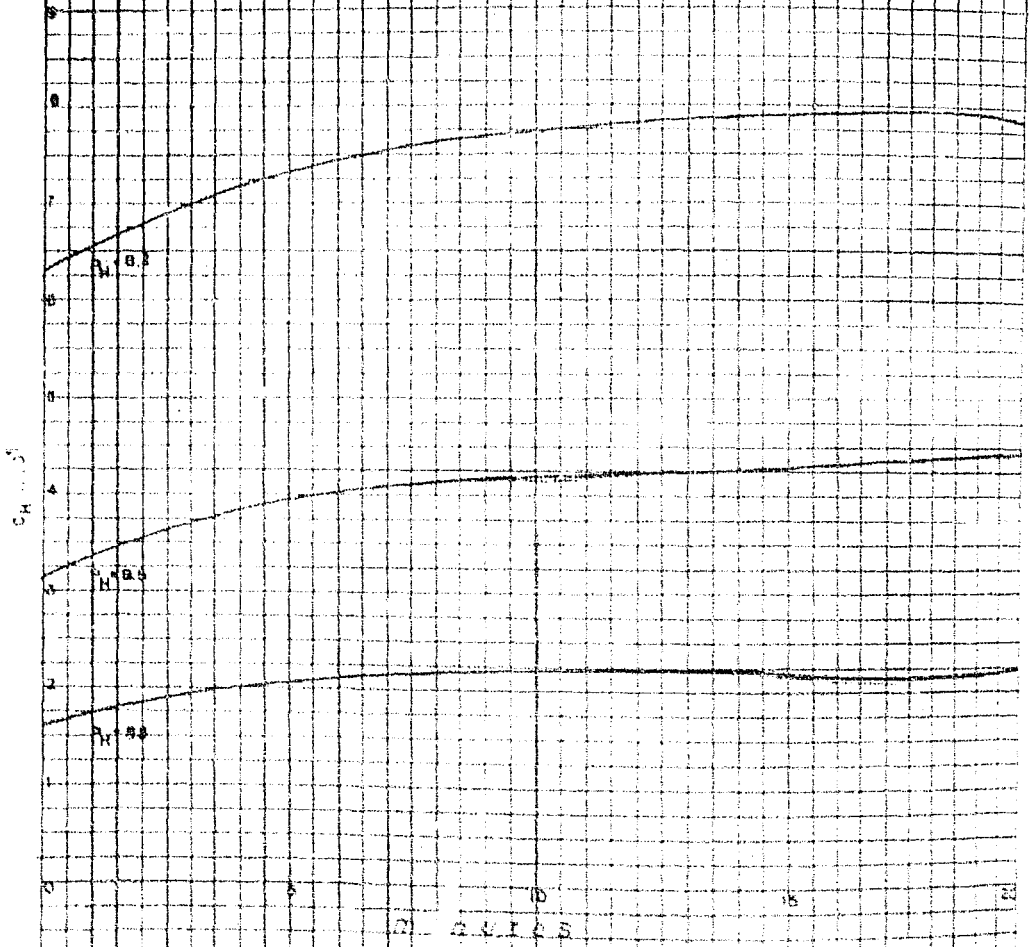
de datos empleando como sustrato:

fosfato feni sódico	5.45 gr.	m. mol. P	
Veronal	5.77		$5 \times 10^{-3}$
H <sub>2</sub> O l <sub>v</sub>	500 ml.	ml.	

# GRAFICA III-1

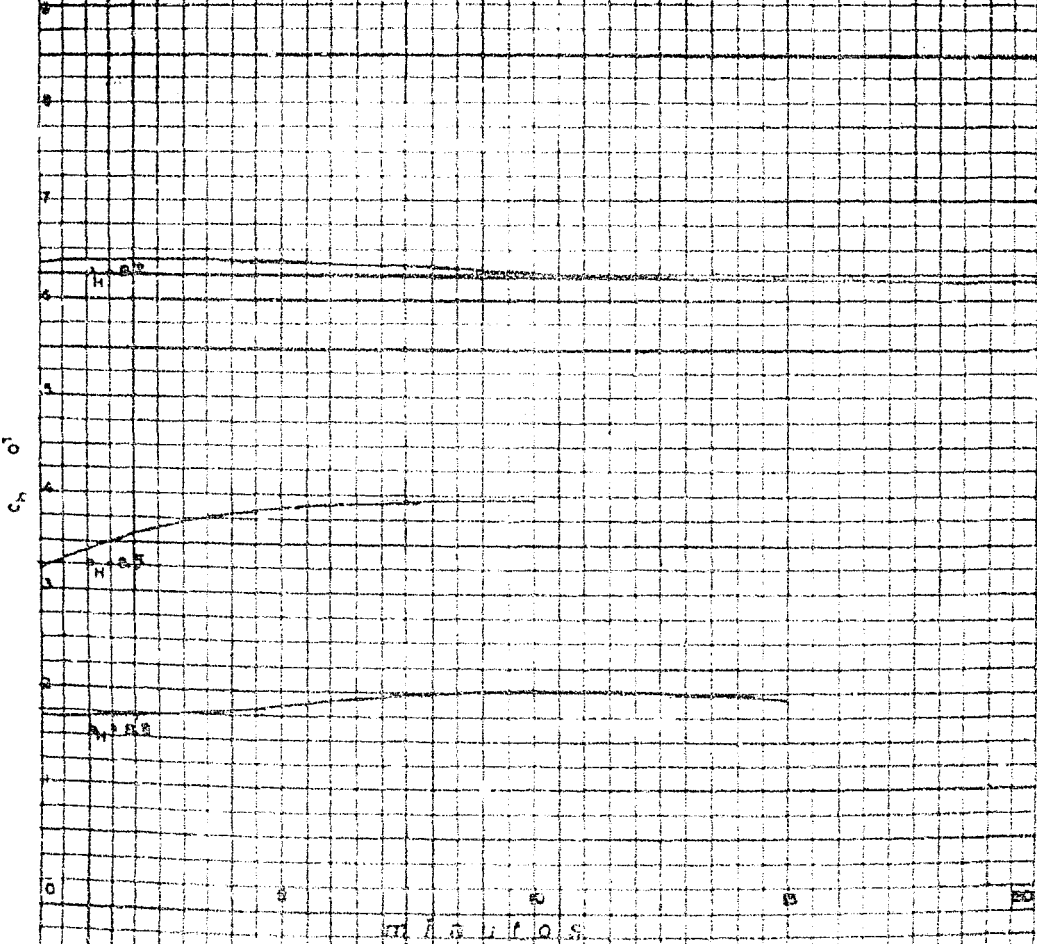


# GRAFICA - III - 2



Construção de ...  
Propriedade de ...  
Sistema de ...

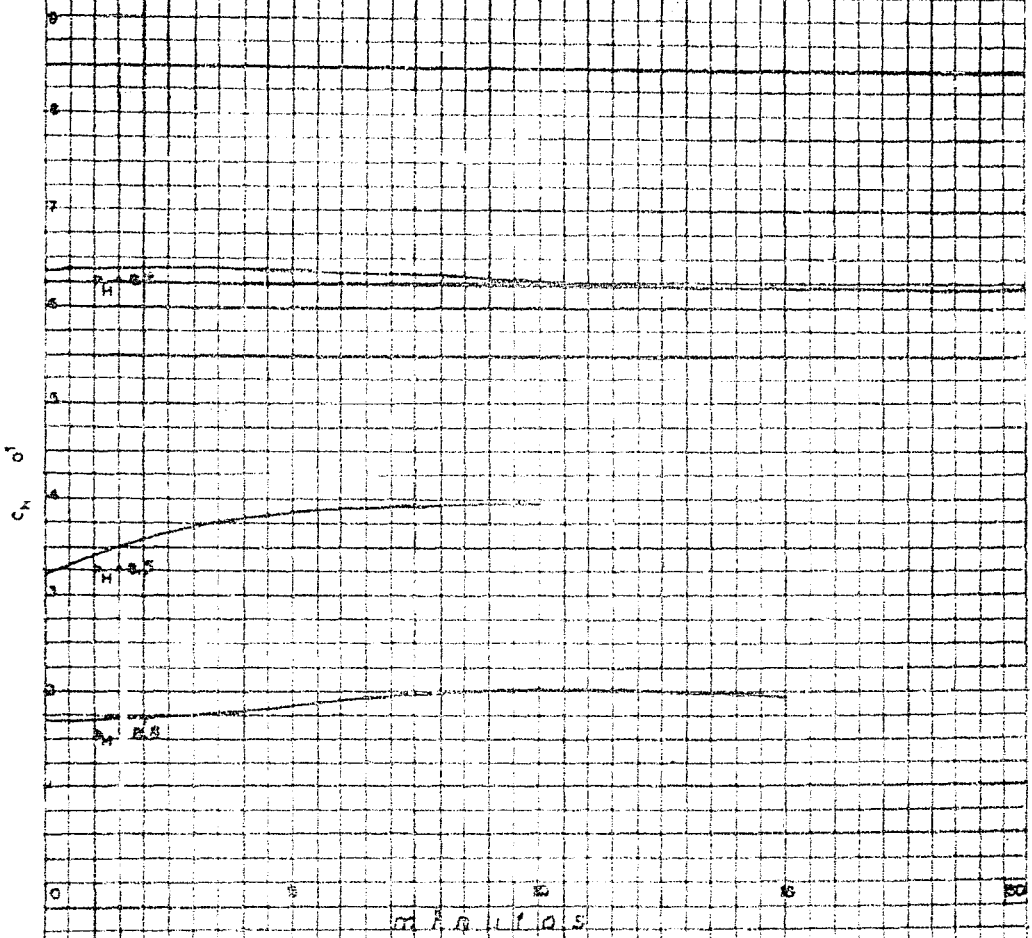
# GRAFICA III-3



Concentração H<sub>2</sub>O tempo  
Concentração Iastarosa 20%  
Sensibilidade para teste sadico



# GRAFICA III - 3



Concentración H<sub>2</sub>O tiempo  
 Concentración Fosfórico 20%  
 Sulfato fosfórico anhídrido

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los tres sistemas estudiados dieron mejores resultados el substrato fosfato disódico y el glicerofosfato.

En el fosfato disódico resultan pendientes en el origen suficientemente características para un pH de 8.2 y 8.8.

Las curvas para 100% y 60% de fosfatasa son suficientemente regulares y características; en cambio, los valores son variables para concentración de fosfatasa de 20%.

En el caso del glicerofosfato la máxima pendiente se obtuvo para un pH de 8.2 y un 100% de fosfatasa.

Para un 60% de fosfatasa también se obtuvo una pendiente máxima para un pH de 8.2.

Como en el caso del fosfato disódico, las concentraciones bajas de fosfatasa no dan gráficas analizables.

De lo anterior se concluye:

1o.—El método potenciométrico puede emplearse como instrumento analítico, midiendo la pendiente en el origen.

2o.—Como substrato puede emplearse el fosfato disódico siempre que exista una substancia capaz de absorber el ión sodio. Lo mismo puede emplearse el glicerofosfato.

3o.—Para el fosfato disódico el pH óptimo es de 8.8 y para el glicerofosfato de 8.2.

4o.—Sólo se obtienen resultados de valor analítico para concentraciones media y altas de fosfatasa.

5o.—El procedimiento podrá ser aplicado a la determinación del grado de la pasteurización de la leche teniendo la ventaja de ser más rápido que el método oficial actual.

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

- 1.—Glasstone S. Textbook of Physical Chemistry. Pág. 1127. 2a. Edición D. Van Nostrand Company Inc. (1948).
- 2.—Getman F. H. y Daniels F. Tratado Moderno de Físico Química. Pág. 378 Compañía Editorial Continental (1955).
- 3.—Balwin E. Aspectos dinámicos de la Bioquímica. Pág. 25 Editorial Argos, S. A. Barcelona. (1951).
- 4.—Payen y Persoz J. A. Chemistry 53, 73 (1833).
- 5.—Summer J. B. y Somers G. F. Chemistry and Methods of Enzymes. Pág. 1 Academic Press Inc. Publishers New York. (1947).
- 6.—Sunner J. B. y Somers G. F. Chemistry and Methods on Enzymes. Pág. 5 Academic Press Inc. Publishers New York. (1947).
- 7.—West E. S. y Tood W. R. Textbook of Biochemistry. Págs. 859-1049 y siguientes. 1149. The Macmillan Co. New York. (1957).
- 8.—Gale E. F. J. Biochemistry 59-675 (1955)
- 9.—Dixon M. and Webb E. Enzymes. Pág. 481. Longmans, Green and Co. London (1958).
- 10.—Dixon M. and Webb E. Enzymes. Pág. 481 Longmans Green and Co. London (1958).
- 11.—Hoheman G. Tratado de Química Orgánica. Pág. 346. Manuel Marín Editor. Barcelona. (1942).
- 12.—Baylies W. M. The nature of Enzyme action. 4a. Edición. Longmans Green and Co. (1919).
- 13.—Haldane J. B. S. Enzymes. Pág. 182 Longmans Green and Co. London (1930).
- 14.—Dixon M. and Webb E. Enzymes. Pág. 300 Longmans Green and Co. (1958).
- 15.—Quastel J. H. Biochemistry J. Pág. 166 Tomo 20. (1926).
- 16.—Massey V. Biochemistry J. Pág. 172 Tomo 55. (1953).
- 17.—Dixon M. and Webb Enzymes. Pág. 313 Longmans Green Co. London. (1958).
- 18.—Leach S. J. Advance Enzymology Pág 1 Tomo 15. (1954).
- 19.—Summer J. B. y Somers G. F. Chemistry and Methods of Enzymes. Pág. 20 y siguientes. Academic Press inc. (1947).
- 20.—Dixon M. and Webb E. Enzymes. Pág. 15 y siguientes. Longmans Green and Co. (1958).
- 21.—Summer J. B. y Somers G. F. Chemistry and Methods of Enzymes. Pág. 12 Academic Press Inc. (1947).
- 23.—Hüchel W. Theoretical principles of Organic Chemistry. Pág. 706 Elsevier publishing Co. (1955).
- 24.—Hine Physical Organic Chemistry Pág. 8 Inc. Graw Hill Book Co. Ind. (1956).
- 25.—Briggs S. Haldane J. Biochemistry J. 19. (1925).
- 26.—" " " " Biochemistry J. 55. 172. (1953).
- 27.—Deulafeu A. D. Morenzi. Curso de Química Biológica. Pág. 212 2a. Edición. Editorial El Ateneo. (1957).
- 28.—Dixon M. and Webb E. Enzymes Pág. 185 Longmans Green and Co. London. (1958).
- 29.—Analytical Chemistry Vol. 30 No 6 Pág. 1114. (1956).
- 30.—Dixon M. and Webb E. Enzymes Pág. 8 Longmans Green and Co. London. (1958).
- 31.—West E. S. y Tood W. R. Textbook of Biochemistry. Pág. 343. The Macmillan Co. (1957).
- 32.—Harroy B. y Mazur A. Tratado de Bioquímica 72. 330. Editorial Interamericana. S. A. (1957).
- 33.—Dixon M. and Webb E. Enzymes Pág. 11 Longmans Green and Co. London (1958).