

5 Gráficas.  
8 Cuadros.

61(24)

UNIVERSIDAD MOTOLINIA



PREPARACION Y TITULACION  
DE BETA GLUCORONIDASA A  
PARTIR DE BAZO DE BUEY

T E S I S

Que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

YOLANDA BEATRIZ MORA VIOLANTE

México, D. F.

1957



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.

PROFESIONAL



tesis profesional

*A ti, que me has dado en la vida los padres que con su ejemplo han sabido guiarme y con su esfuerzo sin límites han hecho posible la coronación de mi carrera.*

*Sr. Emilio Mora y*

*Sra. Matilde Violante de Mora.*

*A mis hermanos Carlos y Emilio.*

*A mis tíos.*

*Al Sr. Dr. Francisco Gómez Mont,  
por su acertada dirección de este trabajo.*

*Este estudio fué realizado en el Laboratorio de  
Hormonas del Hospital de Enfermedades de  
la Nutrición.*

*A la Universidad Motolinía.*

*A mis Maestros.*

## Capítulo I.

### INTRODUCCION.

En años anteriores ha tomado interés el estudio de la Beta Glucoronidasa por varias razones. Está muy relacionada con enfermedades cancerosas, --- puesto que se observa una marcada actividad de esta enzima en la mayoría de los tumores de tejidos humanos, comparados con tejidos normales.

También el uso de la Beta Glucoronidasa para la hidrólisis de glucoronidatos de esteroides, ha encontrado una gran aplicación en la liberación de esteroides conjugados y en el subsecuente aislamiento, principalmente en la orina, evitando el peligro de los efectos producidos por la hidrólisis ácida (1).

Preparaciones de Beta Glucoronidasa reportadas por otros autores.- En 1946 Graham dió un procedimiento de purificación de Beta Glucoronidasa de bazo de buey, usando el fraccionamiento de sulfato de amonio. Smith y Mills prepararon Beta Glucoronidasa de hígado de buey, usando iones metálicos de acetona para fraccionar la enzima. Serker y Sumner usaron la precipitación fraccionada con dioxano a baja temperatura, absorción de fosfato de cal y fraccionamiento con sulfato de amonio para purificar la Beta Glucoronidasa del hígado de vaca (2).

Se han hecho extracciones de vísceras con tejidos de bazo, riñón e hígado. Se ha demostrado que todos contienen una cantidad semejante de glucoronidasa, pero sin embargo, la actividad del bazo es mayor; no obstante, siguiendo el método descrito, se pueden obtener actividades semejantes, tanto del hígado como del riñón (3).

Es evidente que la Beta Glucoronidasa tiene una amplia distribución en los tejidos; los tejidos de ratas son los más ricos y se encuentra también en las siguientes especies: ratón, rata, conejo, perro, gato y hombre.

El hígado, bazo y ciertos tejidos de aparatos reproductivos del siste

ma endócrino tienen alto contenido en Beta Glucoronidasa. La enzima se encuentra en una gran variedad de líquidos del cuerpo humano.

Neuberger y Grauer reportaron la existencia de Beta Glucoronidasa en hígado de pescado, tiburón, *Mustelus calvis* y el congrio angula *Conger conger*. Caracoles, moluscos y varios insectos son fuentes de Beta Glucoronidasa (13).

La actividad de la Beta Glucoronidasa purificada de bazo o hígado de ternera no es proporcional a la concentración de la enzima, a altas diluciones enzimáticas. La relación de la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de la proteína, cuando es graficada contra el logaritmo de la concentración proteínica, produce una curva típica de disociación en forma de "S", que coincide con una curva teórica derivada de la Ley de masas. La adición de una variedad de sustancias a tales soluciones enzimáticas restaura la actividad original, éstas incluyen un filtrado hervido de la solución purificada de la Beta Glucoronidasa del hígado de ternera, D.N.A., albúmina y compuestos amínicos (2).

La enzima en extractos crudos o concentrados parcialmente purificados es marcadamente estable en frío (2).

La actividad de la Beta Glucoronidasa es expresada en términos de microgramos de fenoftaleína liberada en una hora a pH de 5 a 37° de 0.001 M de solución de glucoronidato de fenoftaleína (1).

Massamune dice que la enzima preparada por este método fué específica para Beta Glucoronidasa, sin embargo, no fué así para la hidrólisis del ácido mentol alfa glucurónico, mentol Beta glucósido, mentol alfa glucósido y mentil alfa y Beta glucósidos (5).

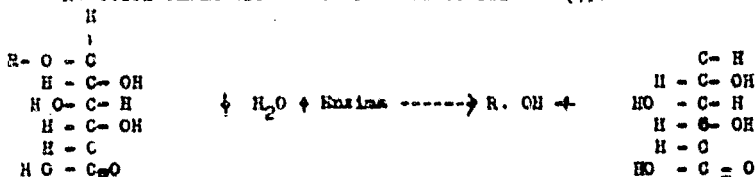
La elevación de la actividad de la Beta Glucoronidasa en neoplasias, fué interpretada como una respuesta metabólica en los tejidos conteniendo estrógenos o de otros esteroides, estrechamente relacionados con esta sustancia.

A vagina, útero y ovario, extirpados a mujeres de diferentes edades -



se les analizó el contenido en beta Glucuronidasa activa. Se observó una disminución de la actividad después de la menopausia (6).

Reacción enzimática de la Beta Glucuronidasa (7).



La Beta Glucuronidasa es una enzima capaz de hidrolizar una gran variedad de glucurónicos conjugados, incluyendo glucuronidato sódico de estriol y pregnandiol (9).

Un examen de los efectos en la variación de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción, las energías y activación y los efectos de varios inhibidores llegan a la conclusión de que estas tres fracciones pueden ser consideradas como enzimas separadas. Se han presentado algunas evidencias para determinar la presencia de estas tres fracciones de Beta Glucuronidasa, en base de - bucy, teniendo un pH óptimo de 3.4, 4.5 y 5.2.

Ha sido demostrado por Oshimo (1936), que varios ácidos carboxílicos - inhiben la preparación de Beta Glucuronidasa. De estos, el ácido cítrico inhibe las fracciones de enzimas con pH óptimo de 3.4 y de 4.5, pero no tiene acción con fracciones de pH óptimo de 5.2 (8).

La purificación de la Beta Glucuronidasa de bazo e hígado de ternera, han enseñado previamente la disociación inactiva a ciertos productos; incrementando la dilución de esta enzima, resulta un descenso progresivo en la actividad enzimática específica.

Han sido encontrados el ácido desoxiribonucleico y algunos otros productos de esta degradación al ser satisfecha la actividad de .

la Beta Glucuronidasa, durante esta prueba. Varios estudios han demostrado -- que el acrecentamiento de la actividad de la Beta Glucuronidasa no tiene límites como la U.N.A. sola, pero que un gran número de otras sustancias produce efectos análogos en el aumento de la actividad enzimática producida por varias concentra- ciones de sustancias y porcentaje determinado por interpolación, viendo que es- tos aumentos fueron producidos por una actividad enzimática con la mitad del má- ximo (12).

El nombre Beta glucuronidato de fenoftaleína fué propuesto por un subs- trato para el ensayo de la actividad hidrolítica de la glucuronidasa. La libera- ción de la fenoftaleína es leída fotocolorimétricamente en solución alcalina.

El espectro de absorción y coeficiente de extinción de la fenoftaleína y el nombre Beta glucuronidato de fenoftaleína pueden ser determinados, mostrando -- que la fenoftaleína puede ser leída colimétricamente en presencia de otros glu- curonidatos con insignificante interferencia (15).

Los valores de metástasis en varios tumores con nódulos linfocitos, fue- ron más grandes que los no envueltos por nódulos linfocitos. Especímenes de mas- titis cística crónica y cervicis de algunas mujeres preñadas, también mostraron aumento en la actividad, un hallazgo atribuido a la estimulación del estrógeno -- aumentado (10).

Cuando los estrógenos son administrados en cantidades fisiológicas a -- ratones ovariectomizados, sigue un incremento de la Beta Glucuronidasa en los -- úteros. Este efecto no ha sido aparentemente estudiado en muchos otros tejidos -- cuando se han administrado grandes cantidades de estrógenos.

Estilbestrol y estrógenos artificiales estimulan la glucuronidasa ute- rina, de la misma manera que los estrógenos naturales dados en estas condiciones.

Esto demuestra que la Beta Glucuronidasa tiene un papel fundametal en la acción fisiológica de las hormonas estrogénicas y la formación de glucuronida- tos, es considerada un proceso de conjugación metabólica (11).

La Beta Glucuronidasa juega un papel importante en el metabolismo y excreción de las hormonas estrogénicas y estas evidencias indican que esta asociación es cerrada, con proceso de división celular y multiplicación. El mecanismo exacto es in vivo, su comportamiento está aún sin afirmarse (12).

-----

## Capítulo II.

### MATERIALES Y METODOS .

#### OBTENCION DE GLUCORONILASA DE BAZO.- TECNICA DE "DOBRINER". (4)

1.- Preparación de polvo seco de bazo.- Se usa bazo de res o de ternera (reactivo 1). Se deseca el tejido conectivo que lo cubre y se pasa por el molino de carne. El bazo molido es vertido a un garrafón de 20 litros añadiéndole acetona (reactivo 2). Se deja en esta condición toda la noche. A la mañana siguiente se separa de la acetona y el residuo del bazo se pone a secar en la obscuridad en cajas de cartón destapadas. La acetona se redestila nuevamente a baja temperatura.

2.- Obtención de glucoronidasa impura.- Se toman fracciones de 50 gramos de polvo seco de bazo y se ponen en frascos de centrifuga de 200 c.c. con 150 c.c. de "buffer" de acetate (reactivo 3) a pH de 4.5.

Se deja separar toda la noche y se centrifuga al día siguiente durante una hora a 2,000 revoluciones por minuto. Se retira el líquido sobrenadante que es adonde está la enzima y se filtra. La enzima contenida en este sobrenadante es precipitada añadiendo el mismo volumen de solución saturada de sulfato de amonio y agitando. Se centrifuga después el frasco a 2,000 revoluciones por minuto durante 30 minutos; se separa el sobrenadante y el precipitado es disuelto en 20 c.c. de agua destilada y se precipita con 20 c.c. de solución de sulfato de amonio, centrifugar y descartar el sobrenadante. El precipitado se disuelve en agua destilada 12.5 c.c. y se reduce en un frasco en la refrigeradora. Cuando se hacen 1,000 c.c., se hace un cuantec con el glucoronidato de fenestaleína.

3.- Purificación por diálisis de la solución de glucoronidasa.- La solución de glucoronidasa es puesta en sacos de celofán de 60 cms. de largo en cantidad de 150 c.c. y dializada por 48 horas. Se certificará si el tubo está bien cerrado inflándole y sumergiéndolo. Sumergir el tubo con la solución de glucoronidasa-

en un matras con agua corriente.

Decantar el sobrenadante café claro del tubo dializado y guardar en el refrigerador. Cuando se llene el frasco, cuantificar actividad enzimática por medio del glucuronidato de fenoltaleína.

4.- Cuantificación de la actividad glucuronidasa de una solución.- Esta se determina por medio de la incubación de un volumen de la solución de la enzima en presencia de glucuronidato de fenoltaleína a 38° durante una hora. La cantidad de fenoltaleína liberada es comparada con una curva estándar de calibración de fenoltaleína, determinándose la cantidad de colorante liberado en la prueba. Una unidad es igual a la liberación de una gama de fenoltaleína por 1 c.c. de la solución.

Con el método anteriormente mencionado, la concentración de actividad enzimática es de 2 a 3,000 unidades por c.c.

TECNICA.- Preparar una serie de tubos, de preferencia celdillas de Evelyn.

Poner en cada uno:

- 1.- 4 c.c. de "buffer" de acetato (reactivo 3).
- 2.- 0.25 c.c. de sustrato de glucuronidato de fenoltaleína (reactivo 4).
- 3.- Calentar los tubos en baño de agua a 38°.
- 4.- Añadir cantidades crecientes de la solución de la enzima 0.01, 0.03 y 0.05 c.c.; por duplicado.
- 5.- Añadir agua destilada a un volumen de 5.5.
- 6.- Incubar a 38° durante una hora exacta, a partir de la adición de la enzima en baño de temperatura constante.
- 7.- Añadir 4.5 c.c. de "buffer" de Glicina (reactivo 5).- Agitar, leer en el colorímetro con filtro 540 mm.
- 8.- La lectura se compara con:
  - a).- Blanco.- Se pone el fotocolorímetro a cero, con un tubo conteniendo 4 c.c. de "buffer" de acetato, 4.5 de "buffer" de glicina y --

1.5 de agua destilada.

b).- Se hace una curva tipo de fenestaleína (reactivo 6) que contiene:

1.- 4 c.c. de "buffer" de acetato.

2.- 4.5 de "buffer" de glicina.

3.- Solución de fenestaleína por duplicado con dosis de 5-10-20 y 50 grmas en cada tube (0.05-0.1-0.2-0.5) de reactivo 6.

4.- Agua destilada para completar a 10 c.c.

9.- Las unidades per c.c. se obtienen a partir de la cantidad de fenestaleína liberada y el volumen de solución de enzima usados. Se expresan como unidades, 1 hora per c.c.

#### REACTIVO 1.

El base de tuco y de ternera se compra directamente en los puestos de mamudo del rancho.

#### REACTIVO 2.

Acetona.- Destilarse a baja temperatura a presión ambiente y guardar se en garrafones de 20 litros.

#### REACTIVO 3.-

"Buffer" de acetato 0.1 M.

Acetato de sodio 5.785 granes.

Acido acético glacial 3.25 c.c.

Llevar a un litro con agua destilada.- Guardar en el refrigerador.-

Verificar el pH que debe ser de 4.5.

#### REACTIVO 4.

Solución de ácido manoglucurónico de fenestaleína 0.01 M. Se obtiene de "Sigma C".

La forma es la de la sal cinconidina del ácido manoglucurónico de fenestaleína. Esta se hidreliza en la siguiente forma: pesar 394 mgms. (= 1/2,000 molar) de la sal.

Llevarlos a 50 c.c. en ácido clorhídrico 2N a un embudo de separación y extraer la mezcla con acetato de etilo usando un lavado.

El acetato de etilo es evaporado, nunca a más de 45°. El residuo es el ácido monoglucurónico de fenoftaleína libre.

Recoger el residuo con un poco de agua destilada. Pasar la suspensión a un matraz volumétrico de 50 c.c. Neutralizar agregando sosa N. y llevar a 50 c.c. con agua destilada. Esta solución ligeramente turbia es casi 0.01 N. Guardar en el refrigerador.

REACTIVO 5.

"Buffer" de glicina 0.4 M.

Acido amino acético 16.3

Cloruro de sodio 12.65

Disolver en agua destilada. Agregar 10.9 de hidróxido de sodio concentrado (100 gramos de sosa por 100 c.c. de agua). Llevar a un litro con agua; guardar en el refrigerador pH de 10.5.

REACTIVO 6.

Solución de fenoftaleína.

Se prepara una solución "tipo" de fenoftaleína de 100 mgms. en 100-c.c. de alcohol al 80%. Hacer una dilución que contenga 100 gamas-sobre c.c. de alcohol al 80%, 100 gamas en 0.1 c.c. Se toman 2.5 - c.c. de la solución igual (2,500 gamas) y se llevan a 25 c.c. en --- alcohol al 80% (2,500 gamas = 25 c.c.)

( 250 gamas = 2.5. c.c.)

( 25 gamas = .25 c.c.)

( 10 gamas = .10 c.c.)

- - - -

CAPITULO III.PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.1.- Uniformidad de color de la solución de fenoftaleína.

Para obtener una mayor exactitud de los volúmenes empleados en la uniformidad de color se hicieron lecturas en varias series de 10 tubos centeniende: en la primera, .1 de fenoftaleína, 4 c.c. de "buffer" de acetato, 4.5 c.c. de "Buffer" de glicina y agua destilada a completar a 10 c.c. y en la segunda serie, .2 de solución de fenoftaleína y las mismas cantidades de las soluciones "buffer" aforando a 10 c.c. con agua destilada, hasta que en todas las series coincidieron cuando menos el 90% de las lecturas.

CANTIDAD DE SOLUCION DE FENOFTALEINA	DENSIDAD OPTICA	DIFERENCIA CON EL PROMEDIO	CANTIDAD DE SOLUCION DE FENOFTALEINA	DENSIDAD OPTICA	DIFERENCIA CON EL PROMEDIO
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1278	- 0.047	0.2	.2480	- .016
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2403	+ .061
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2403	+ .061
0.1	.1337	+ 0.008	0.2	.2480	- .016
0.1	.1278	- 0.047	0.2	.2480	- .016
PROMEDIO	.1325			.2464	

2.- Curva de calibración de fenoftaleína.

Esta curva contiene los reactivos como se indicó en la descripción --



del método. Se hicieron cinco curvas con diferentes diluciones para obtener la curva tipo de fenoftaleína. En la curva tipo se hicieron diluciones por duplica de de la solución de fenoftaleína con dosis de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 gamas en cada tubo (0.05-0.1-0.2-0.3-0.4 y 0.5).

Los resultados de las lecturas fueron los siguientes:

CANTIDAD DE SOLUCION  
DE FENOFTALEINA.                      DENSIDAD OPTICA.

.05	.0617
.05	.0617
.1	.1367
.1	.1367
.2	.2736
.2	.2736
.3	.423
.3	.423
.4	.553
.4	.553
.5	.678
.5	.678

Para construir la curva se procedió a colocar en el eje de las abscisas las lecturas dadas por el fotocolorímetro, con sus correspondientes correcciones y en el eje de las ordenadas las concentraciones, como se ve en la gráfica número 1.

### 3.- Cuantificación de la actividad de la solución de glucoronidasa.

Se hizo con el objeto de determinar la actividad enzimática de la glucoronidasa para saber cuantas unidades contiene por c.c. Se efectuaron dos de--

terminaciones en dos lotes diferentes de glucoronidasa: en el primero la actividad enzimática de la glucoronidasa nos dió las siguientes lecturas:

CANTIDAD DE -  
SOLUCION DE -  
GLUCORONIDASA      DENSIDAD OPTICA.      UNIDADES /C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.01	.1612	15	1,500
.01	.1612		
.03	.444	43	1,430
.03	.444		
.05	.699	65	1,500
.05	.699		
			SUMA. 4,430

Las unidades se obtuvieron localizando las lecturas en la curva tipo -- de fenoftaleína, como se ve en la gráfica número 2. El total de unidades que contiene la glucoronidasa por c.c. se obtiene dividiendo las unidades de cada lectura entre su correspondiente dilución y el total de estas unidades dividido entre 3 nos dá el resultado final, que en este caso fué de 1,477 unidades por c.c.

En la segunda determinación se procedió exactamente igual que para la primera y las lecturas obtenidas fueron las siguientes:

CANTIDAD DE -  
SOLUCION DE -  
GLUCORONIDASA      DENSIDAD OPTICA.      UNIDADES /C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.01	.312	28.5	2,850
.01	.312		
.03	.488	45	1,500
.03	.488		
.05	.545	52	1,000
.05	.545		
			SUMA. 5,350

El total de unidades dividido entre 3 dió una actividad enzimática de 1,763 unidades por c.c.; como se ve en la gráfica número 3.

4.- Actividad enzimática del bazo fresco.

Se partió de 7.200 kmas. de bazo fresco; bazo (ensima), del total se tomaron en series de 4: 2 gramos, 1 gramo, .50 gramos y .1 de gramo. Se colocaron en tubos de caldillas respectivamente; se disolvió el bazo en 2 c.c. de acetato "buffer" y se le añadieron los reactivos descritos para la cuantificación de la gluceronidasa.

De cada serie de 4 tubos, a dos se les agregó gluceronidato de fenoftaleína y a los otros dos agua, que sirvieron como blancos, procediéndose en la misma forma para cada serie. Al terminar la reacción se filtró el líquido de cada tubo y se procedió a su lectura.

Las lecturas dadas fueron las siguientes:

CANTIDAD DE BAZO	DENSIDAD OPTICA.	UNIDADES /C.C.	TOTAL DE UNIDADES.
.1 G.F.	.1177		
.1 G.F.	.1177		
.1 AGUA	.426		
.1 AGUA	.426		
.5 G.F.	.2255		
.5 G.F.	.2255		
.5 AGUA	.1121	.1134	
.5 AGUA	.1121		
1 G.F.	.377		
1 G.F.	.377		
1 AGUA	.382		
1 AGUA	.382		
2 G.F.	.939		
2 G.F.	.939		
2 AGUA	.810	.129	
2 AGUA	.810		

G.F. Gluceronidato de fenoftaleína.

El total de unidades dividido entre 3 dió una actividad enzimática de 1,783 unidades por c.c.; como se ve en la gráfica número 3.

#### 4.- Actividad enzimática del bazo fresco.

Se partió de 7.200 kgs. de bazo fresco; bazo (enzima), del total se tomaron en series de 4: 2 gramos, 1 gramo, .50 gramos y .1 de gramo. Se colocaron en tubos de celdillas respectivamente; se disolvió el bazo en 2 c.c. de acetate "buffer" y se le añadieron los reactivos descritos para la cuantificación de la glucoronidasa.

De cada serie de 4 tubos, a dos se les agregó glucoronidato de fenoftaleína y a los otros dos agua, que sirvieron como blancos, procediéndose en la misma forma para cada serie. Al terminar la reacción se filtró el líquido de cada tubo y se procedió a su lectura.

Las lecturas dadas fueron las siguientes:

CANTIDAD DE BAZO      DENSIDAD OPTICA.      UNIDADES /C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.1 G.F.	.1177		
.1 G.F.	.1177		
.1 AGUA	.426		
.1 AGUA	.426		
.5 G.F.	.2255		
.5 G.F.	.2255		
.5 AGUA	.1121	.1134	
.5 AGUA	.1121		
1 G.F.	.377		
1 G.F.	.377		
1 AGUA	.382		
1 AGUA	.382		
2 G.F.	.939		
2 G.F.	.939		
2 AGUA	.810	.129	
2 AGUA	.810		

G.F. Glucoronidato de fenoftaleína.

Las lecturas finales del problema se les restó el blanco.

Como se puede observar no hubo actividad enzimática.

5.- Actividad del polvo seco de bazo.

Después de haber macerado el bazo fresco con acetona, se secó y pesó.- El peso fué de .700 gramos.

Una vez obtenido el polvo seco de bazo se procedió a medir su actividad enzimática, pesando en series de 4: 1 gramo, .1 de gramo y .5 de gramo respectivamente; se procedió en la misma forma que para medir la actividad del bazo fresco. Las lecturas obtenidas fueron las siguientes:

CANTIDAD DE POLVO SECO DE BAZO.      DENSIDAD OPTICA.      UNIDADES/C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.1 G.F.	.330		
.1 G.F.	.330	2.683	
.1 AGUA	.0617		
.1 AGUA	.0617		
.5 G.F.	.0014		
.5 G.F.	.0014	2.692	
.5 AGUA	99		
.5 AGUA	99		
1 G.F.	.2861		
1 G.F.	.2861	1.404	
1 AGUA	.1457		
1 AGUA	.1457		

No hubo tampoco actividad enzimática.

6.- Purificación por diálisis de la glucoronidasa. Actividad enzimática antes y después de diálisis.

antes de diálisis.

CANTIDAD DE -  
 SOLUCION DE -  
 PENCFTALEINA.      DENSIDAD OPTICA.      UNIDADES / C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.01	.312	28.5	2,850
.01	.312		
.03	.488	45	1,500
.03	.488		
.05	.545	52	1,000
.05	.545		
			SUMA. 5,350

La suma de las unidades dividida entre 3, nos dió una actividad enzimática de 1.783 unidades por c.c., como puede observarse en la Curva número 4.

Después de diálisis.

CANTIDAD DE -  
 SOLUCION DE -  
 PENCFTALEINA.      DENSIDAD OPTICA      UNIDADES / C.C.      TOTAL DE UNIDADES.

.01	.3328	22	2,200
.01	.3328		
.03	.456	42	1,400
.03	.456		
.05	.629	58	1,760
.05	.629		
			SUMA. 5,360

La actividad enzimática, como se puede observar en la Curva número 5, -  
 fué de 1,786 unidades por c.c.

CAPITULO IV.

## CONCLUSIONES.

---

El método usado fué satisfactorio. Se obtuvieron 1,500 unidades de glucoronidas aproximadamente, por c.c.

Se observó que con la diálisis no se obtiene aumento de actividad, puesto que midiendo la actividad enzimática antes y después de diálisis, el resultado es el mismo.

---

CAPITULO V.BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Fishman, W.H. and Peter Bernfeld. "Purification of calf spleen Beta Glucuronidase". Biol. Chem. 202,757 (1953).
- 2.- Fishman, W.H. and Bernfeld, P. in Colowick, S. P.; and Kaplan, N.O. "Glucuronidases Methods in enzymology" New York, I, 262 (1955).
- 3.- Fishman, W.H. and Talalay, P. A. Simplified Method of Preparing -- Active. "Extracts of Beta Glucuronidase". Science, 195, 131 (1947).
- 4.- Comunicación personal.
- 5.- A.F. Graham. "Ox-spleen Beta Glucuronidase; its Purification and -- study of some Factors". Involved in Assaying its Activity. Biochem. J. 40,603 --- (1946).
- 6.- Fishman, W.H. and Aulyan; A.J. "Beta Glucuronidase activity in --- Human Tissues". Cancer Research, 7,208 (1947).
- 7.- Fishman W.H. and Sidney Green. "Enzymatic Catalysis of Glucoronyl-Transfer". J. Biol. Chem. 225,435 (1957).
- 8.- Mills, G.T.; Paul J. Ard Smith, E.E.B. "Studies of Beta Glucoronidase". Biochem J. 53,232 (1953).
- 9.- Fishman W.H. Relationship between. "Estrogens and Enzyme Activity". Vitamins and Hormones. Robert S. Harris y Kenneth V. Thimann. Academic Press in- Publishers New York. II,226 (1951).
- 10.- Jesse P. Greenstein and Alton Keester. "Tumor Enzymology". The --- Enzymes. J.B. Sumner y K. Myrbeck. Vol I. Part 2, 1163 (1952).
- 11.- W.H. Fishman "Beta Glucuronidase: Its relation to the action of -- the estrogenic Hormones" J. Biol. Chem. 169,7 (1947).
- 12.- Fishman W.H. Beta Glucuronidase. "The Enzymes". J. B. Sumner y K.- Myrbeck. Vol. I Part 1, 635 (1950).



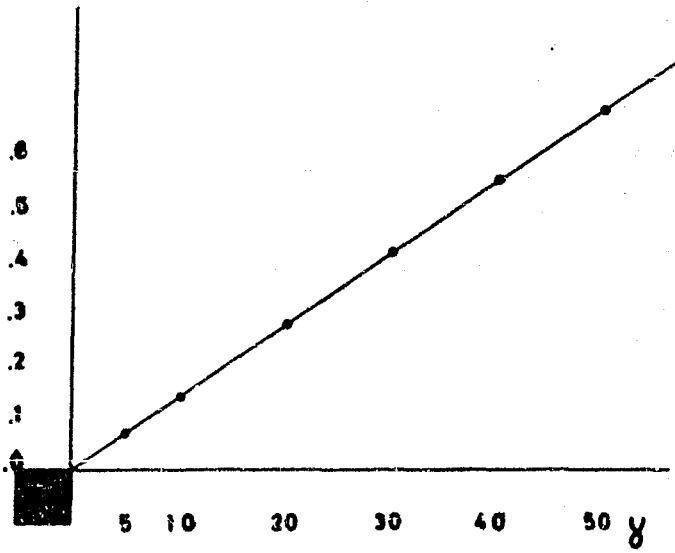
13.- Fishman W.H. "Distribution of Beta Glucuronidase. Advances of --  
Enzymology". F. P. Nord, Interscience.

14.- P. Bernfeld, H. Bernfeld, W.H. Fishman. "Substrates enhancing --  
the activity of Beta Glucuronidase". Federation Prod. 12, 177 (1953)

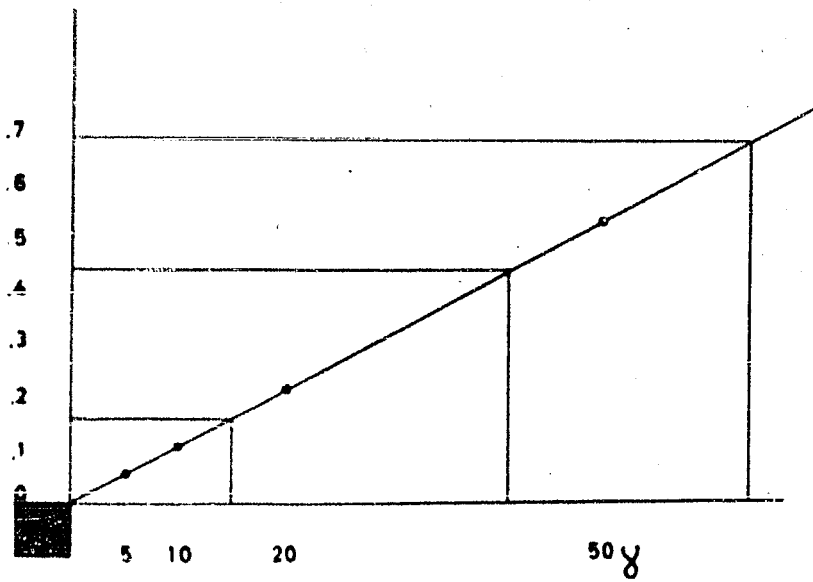
15.- Tolalay, F. Fishman, W.H. and Helgins C., J. Biol. Chem. 166,757  
(1946).

-----

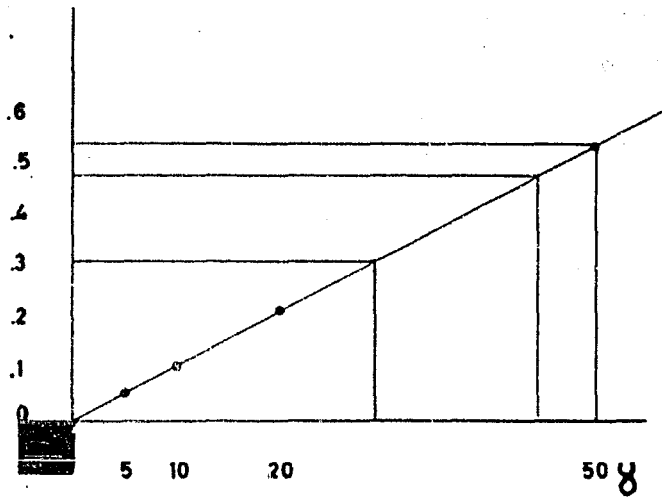
# GRAFICA No.1



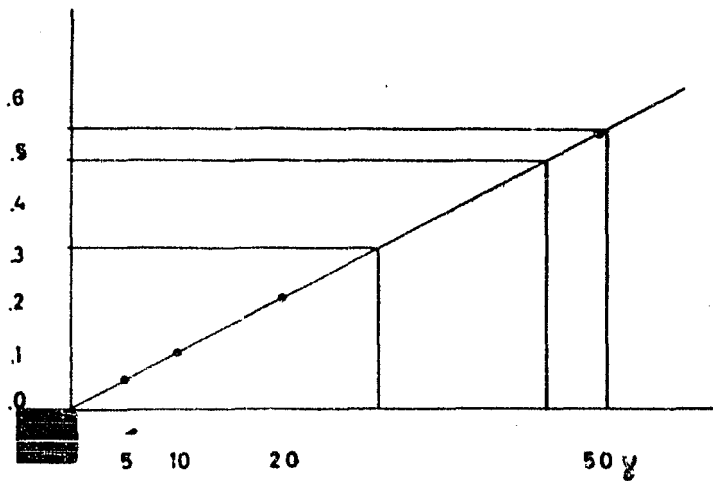
# GRAFICA No. 2



# GRAFICA No. 3

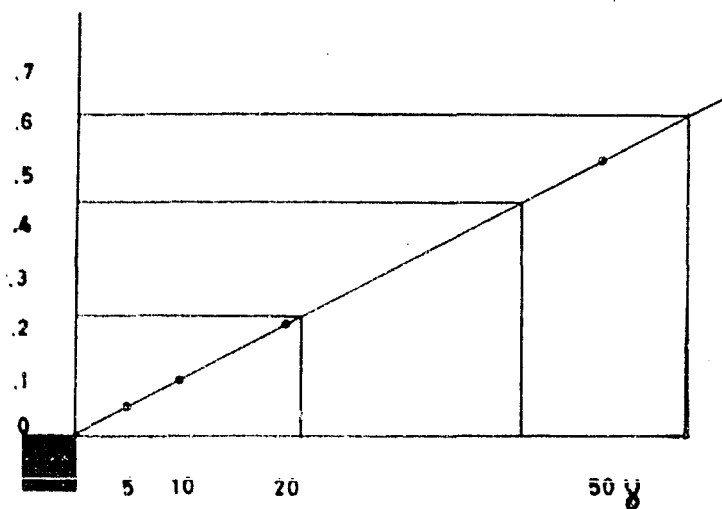


# GRAFICA No. 4



Antes de Diálisis.

# GRAFICA No. 5



Después de Diálisis.