

## APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UN MODELO ANIDADO DE TRES VIAS A LA VALORACIÓN DE INSULINA

*M<sup>a</sup> Carmen Bedmar Abril; Farhat Randa; Antonio Cerezo Galán*

*F. Farmacia; Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica; Campus de Cartuja s/n, 18071-Granda*

### Introducción

La complejidad química de la insulina, variable con su origen, los procedimientos por los que se obtiene y purifica y su comportamiento fisicoquímico diferente cuando cambian las características del medio, son factores determinantes, entre otros, de la dificultad de aplicar un método químico o fisicoquímico de valoración de la hormona. Por su parte, los métodos biológicos de valoración se caracterizan por ser bastante complejos y poco exactos, haciendo imposible que puedan ser aplicados a un control rutinario de preparados de insulina. Por todo lo expuesto, constituye una finalidad de especial interés el disponer de una técnica analítica para valorar insulina de forma directa, sea por método químico o fisicoquímico y que posea la suficiente simplicidad para ser aplicado a valoraciones rutinarias de control.

### Materiales y Métodos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico para cromatografía. Se utilizó polvo de insulina comercial que posee una actividad de 25,7 UI/ mg. Se emplea como preparado estándar de comparación el cuarto estándar internacional de insulina con actividad de 24 UI/ mg, gentilmente suministrado por el "Istitute for Biological Standar and Control".

Los reactivos utilizados fueron:

Solución de desarrollo: solución de ácido acético al 1% saturada de isobutanol

Solución de revelado: solución de verde de bromocresol de pH de 3,6

Solución de lavado de los cromatogramas: ácido acético al 1% (v/v) en agua.

Solución eluyente: mezcla a partes iguales de NaOH (0,1N) y alcohol de 96°.

Cámaras de cromatografía: se emplean 3 cámaras (A, B y C) de diferente tamaño y coloración de vidrio transparente.

Papel cromatográfico: tiras de acetato de celulosa numero 1 de 57 x 46 cm.

Método analítico: Como técnica analítica se aplica el método cromatográfico de Fenton (1,2) que realiza una cromatografía de sustrato plano ampliamente estudiados y modificados en sus aspectos de aplicación en trabajos anteriores (3). La insulina contenida en la muestra se pasa a una solución ácida y se depositan volúmenes de 5 y 10  $\mu$ l de soluciones problema y estándar sobre el sustrato cromatográfico y se colocan las tiras dentro de las cámaras con el líquido de desarrollo, siendo el tiempo de saturación de las cámaras de 4 horas. Posteriormente se revelan los cromatogramas después de que el frente alcanzado por el líquido de desarrollo avanza hasta una altura de 20 cm y se eluyen. finalmente, se determina su absorbancia por espectrofotometría a 625 nm empleando un espectrofotómetro Beckman modelo DB-G.

### Resultados y Discusión

Para la ordenación de los datos experimentales se emplea un diseño en "cuadrado latino" (4), tal diseño posee multitudes posibilidades de ordenación de las distintas muestras (estándar y problema a alta y baja concentración). De todas

## 8 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF

las ordenaciones, se ha seleccionado una de ellas que se recoge en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Modelo de ordenación de los datos experimentales en un cuadro latino de orden 4. FT: totales filas; TT: totales tratamientos; TG: total general

Posición						
Tiras	1	2	3	4	FT	TT
1	X11	X12	X13	X14	F <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>
2	X21	X22	X23	X24	F <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>
3	X31	X32	X33	X34	F <sub>3</sub>	D <sub>3</sub>
4	X41	X42	X43	X44	F <sub>4</sub>	D <sub>4</sub>
CT	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	TG	T

En ella X<sub>ij</sub> se refiere a la respuesta medida del tratamiento que figura en la fila i columna j, y que corresponde a uno de los cuadros latinos posibles; F<sub>i</sub> y C<sub>j</sub> son la suma total de la fila i y columna j, respectivamente; D<sub>h</sub> es el total de tratamiento h y T es la suma total de los datos incluidos en la tabla y alude a la suma total de resultados de los cuatro: estándar baja (S1), de los cuatro estándar alta (S2), de los cuatro problema baja (T1) y de los cuatro problema alta (T2).

Las respuestas totales medidas para S1, S2, T1 y T2 anteriormente citados corresponden a los obtenidos en una sola experiencia. Si se realizan "r" experimentos en cada una de las "t" cámaras cabe considerar entonces un modelo de análisis de varianza de cuatro vías en el que la primera vía son las cámaras (A= tratamiento fijo), la segunda las experiencias (B= tratamiento aleatorio), la tercera el tipo de sustancias, estándar o problema, (C= tratamiento fijo) y la cuarta las dosis, alta o baja (D= tratamiento fijo). Como la segunda vía es un tratamiento aleatorio que se encuentra anidada con la primera, se tendrá, entonces, un modelo anidado de tres vías fijas. Para obtener el análisis para el modelo anidado se diseña la Tabla 2 que permite fácilmente obtener los datos

necesarios y realizar los tests, teniendo en cuenta que el factor A tiene r niveles, el B, t niveles y los factores C y D dos niveles cada uno.

**Tabla2:** Modelo de ordenación de los datos necesarios para el análisis de varianza en un modelo anidado de tres vías fijas. g.l: grados de libertad; Sc: suma cuadrados; mc: sc/g.l.

Fuentes	g.l	Sc	mc	F exp.	Significación
A	r-1	A		B	
B	r (t-1)	B+AB		BCD	
C	1	C		BC	
D	1	D		BD	
AC	r-1	AC		BC	
AD	r-1	AD		BD	
CD	1	CD		BCD	
BC	r (t-1)	BC+ABC		BCD	
BD	r (t-1)	BD+ABD		BCD	
ACD	-1	ACD		BCD	
BCD	r (T-1)	BCD+ABCD		-----	-----

Se obtienen las absorbancias totales medidas para cada concentración de insulina (2,5; 5; 10; 15; 17,5 y 20 mg/ ml) en cada experiencia y para cada una de las tres cámaras y a modo de ejemplo se expondrá sólo los referidos a las concentraciones de 2,5 y 10 mg/ ml en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3:** Absorbancias totales para C= 2,5 mg/ ml

Sustancia		Problema		Estándar	
Dosis		Baja T1	Alta T2	Baja S1	Alta S2
Cámaras	Experiencias	Suma de los 4 valores obtenidos en el cuadrado latino			
A	1	0,109	0,310	0,100	0,357
	2	0,140	0,360	0,145	0,360
	3	0,175	0,435	0,190	0,450
B	1	0,139	0,395	0,142	0,400
	2	0,160	0,385	0,145	0,375
	3	0,125	0,360	0,120	0,375
C	1	0,105	0,342	0,110	0,360
	2	0,140	0,300	0,125	0,310
	3	0,125	0,325	0,110	0,325

Tabla 4: Absorbancias totales para C= 10 mg/ml

Sustancia		Problema		Estándar	
Dosis		Baja T1	Alta T2	Baja S1	Alta S2
Cámaras	Experiencias	Suma de los 4 valores obtenidos en el cuadrado latino			
A	1	1,170	2,450	1,120	2,500
	2	1,380	2,610	1,430	2,660
	3	0,920	2,270	0,880	2,260
B	1	0,840	2,070	0,825	2,090
	2	0,930	2,280	0,870	2,250
	3	1,110	2,630	1,080	2,740
C	1	0,485	1,630	0,510	1,615
	2	0,530	1,805	0,555	1,730
	3	0,800	1,880	0,750	1,940

El análisis de la varianza de los datos de dichas tablas se resume en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de las significaciones obtenidas en el análisis de varianza.

C	2,5	5	10	15	17,5	20
Efecto						
Cámaras	NO	NO	5%	NO	NO	NO
Experienc.	1%	6%	1%	1%	1%	1%
Sust.	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Dosis	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Cámara x sust.	NO	NO	NO	NO	NO	5%
Cámara x dosis	NO	NO	1%	NO	NO	NO
Sust. X dosis	10%	NO	NO	NO	NO	NO
Exp. X sust.	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Exp. X dosis	5%	NO	NO	5%	1%	1%
Cámara x sust.X dosis	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Los datos de las Tablas reflejan que nunca aparecen diferencias de absorbancia entre cámaras, tampoco entre sustancias; sin embargo las diferencias significativas aparecen entre dosis y entre experiencias, lo que señala la

conveniencia de considerar las experiencias individualmente; se destaca que la menor variabilidad se da en las concentraciones 5 y 10 mg/ml, lo que hace adecuado el uso de tales concentraciones.

Respecto a los efectos de interacción doble, las interacciones cámaras-sustancia es solo significativa a los 20 mg/ml, lo cual puede deberse a la posible existencia de una modificación molecular de la insulina por agregación de la misma ya que se encuentra en concentración muy elevada. Por su parte las interacciones sustancia-dosis; experiencias-sustancias y cámara-dosis nunca son significativas; en cuanto a la interacción experiencias-dosis es significativa con todas las dosis salvo a las 5 y 10 mg/ml. Por último la interacción triple, que es la menos deseable de todas, nunca es significativa. De todo lo anterior se deduce que las concentraciones de 5 y 10 mg/ml son las más adecuadas y que las experiencias han de realizarse de forma individual

### Bibliografía

1. Fenton E. L., Biochem. J., 71, 507 (1951).
2. Fenton E. L., Biochem. J., 81, 570 (1961).
3. Bedmar Abril, M. C., Tesis doctoral, Dpto. Farmacia Galénica, Granada, 1986.
4. Martín Andres A., Luna del Castillo J., Bioestadística para las ciencias de la salud, Norma, Madrid, 1999.

Autor de contacto:  
 M<sup>a</sup>Carmen Bedmar Abril  
 mbedmar@ugr.es  
 F. Farmacia  
 Campus de cartuja s/n  
 Granada  
 Telf.: 958-243904  
 Fax:958-248958