

Instituto de Fisiología. — Facultad de Medicina. — Barcelona
Prof. J. Jiménez-Vargas

Substratos bicromógenos de hidrólisis rápida para fosfatasas

por J. Monche *

(Recibido para publicar el día 30 de noviembre de 1950)

La velocidad de reacción de los procesos enzimáticos depende esencialmente, como es sabido, de la naturaleza del enzima, de la del sustrato, de la composición del medio común a ambos, de la concentración de todos y cada uno de los componentes del sistema y de la temperatura de incubación, siendo un hecho ya conocido desde hace tiempo (7) que las fosfatasas hidrolizan con distinta velocidad los diferentes ésteres fosfóricos; pero no sólo la velocidad de hidrólisis, sino incluso el pH óptimo varían mucho según el éster empleado, aun tratándose de sustratos tan relacionados entre sí como los ésteres *alfa* y *beta*-glicero fosfóricos. Cambios mayores en la estructura del sustrato llegan a provocar diferencias mucho más acentuadas, de tal modo que, por ejemplo, el fosfato de fenilo es hidrolizado con doble velocidad que el glicero-fosfato y aun mucho más rápidamente que el fosfato de etilo, bajo la acción de la fosfatasa ósea, según King y Armstrong (3).

Parte experimental

Hemos estudiado, comparativamente con el fenoltaleinfosfato sódico, la hidrólisis enzimática de las sales sódicas de los ésteres fosfóricos de las hidroxifucosinas aurina y benzaurina y la de los ésteres fosfóricos del ácido 4,4'-hidroxiazobenceno-sulfónico, del 4,4'-amidossulfonilbenceno-azo-fenol, del 3,4'-toluil-azo-fenol, del

* Comunicación presentada personalmente en versión inglesa en el XVIII Congreso Internacional de Fisiología, celebrado en Copenhague (Dinamarca) en agosto último.

4'-fenil-azo-fenol y la de los ésteres isómeros (2, 3 y 4), 4'-carboxil-azobenceno-fosfóricos, éstos últimos comparativamente entre ellos y salvo el éster fenolftaleínico, se obtienen todos por primera vez.

A tal fin hemos aplicado sin dificultad la técnica de fosforilización de King modificada por nosotros (5) para la síntesis de los ésteres de las dos hidroxifucsonas de referencia, mas no en cambio para la de los ésteres de los restantes compuestos citados, todos ellos pertenecientes al grupo de colorantes hidroxiazoicos como es sabido, ya que carece por completo de interés, dada la tendencia de dichos colorantes, al menos los estudiados por nosotros, a permanecer inalterados bajo la acción del oxiclورو de fósforo. Por tal motivo, hemos recurrido satisfactoriamente a un método indirecto de fosforilización, consistente en sustituir el fenol, necesario al copularlo con las sales de diazonio correspondientes para la síntesis de dichos colorantes azóicos, por el fenilfosfato sódico, operando muy cuidadosamente en medio amoniacal a pH siempre inferior a 8 (procurando mantenerlo entre 7-7,5), o sea de modo enteramente similar al descrito por Monche en un trabajo anterior (9), para la copulación del ácido acetilsalicílico con sales de diazonio.

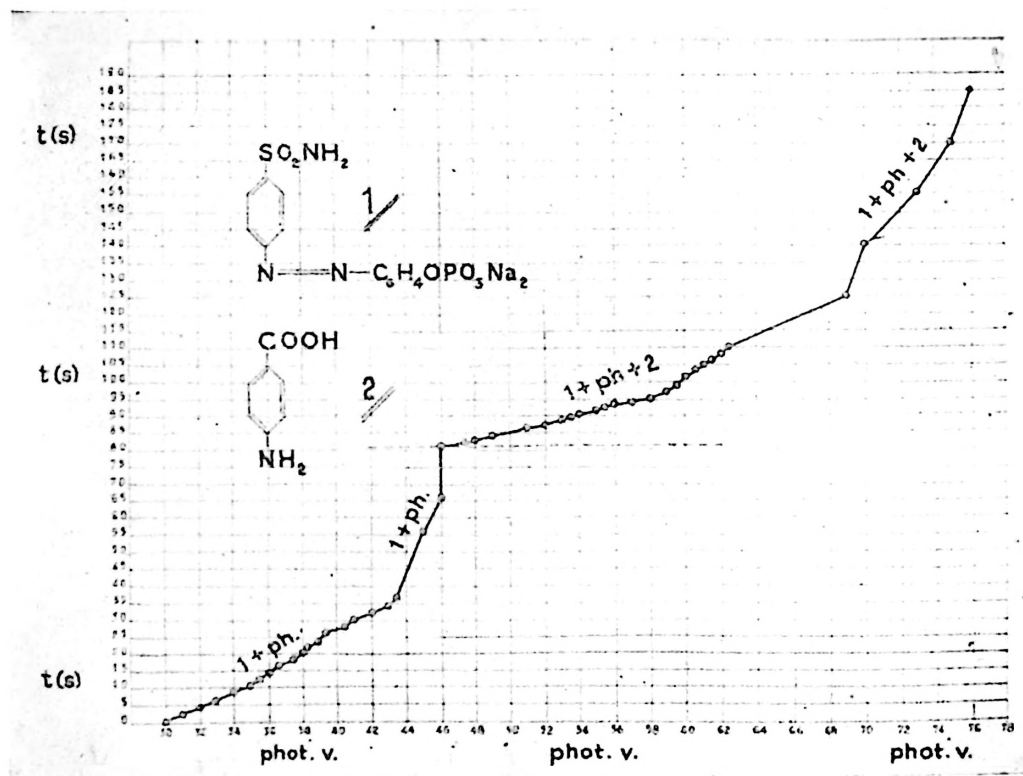
Y un hecho se observa claramente como consecuencia de la labilidad extraordinaria de los ésteres fosfóricos resultantes, que explicaremos más adelante, en otro lugar de este trabajo; hecho que consiste en su velocidad de hidrólisis, puesto que bajo la acción de las fosfatasas (por ejemplo la fosfatasa alcalina de intestino de ratón), a la simple temperatura ambiente y aun incluso a temperaturas comprendidas entre 5 y 10°C., se hidrolizan con gran rapidez, muy superior en cualquier caso a la del fenolftaleinfosfato sódico y superior esta última a su vez a la de los ésteres fosfóricos de las dos hidroxifucsonas que hemos obtenido y cuyo estudio químico detallado, al igual que el de todos los nuevos ésteres fosfóricos de los colorantes monohidroxiazoicos de referencia, será objeto de atención especial en otra publicación.

Pero la comparación de la velocidad de hidrólisis fosfatásica de unos y otros substratos cromógenos, no es pues posible, conforme se comprenderá, sobre todo por lo expuesto más adelante, salvo tener en cuenta la distinta temperatura de incubación muy superior, requerida por los ésteres fosfóricos de la fenolftaleína e hidroxifucsonas; ofreciendo en cambio la hidrólisis enzimática de estos últimos un caso perfectamente comparable al del rosolilfosfato sódico estudiado por nosotros (5), puesto que se observa asimismo una velocidad de hidrólisis enzimática algo inferior a la del fenolftaleinfosfato sódico en las sales sódicas de los ésteres fosfóricos de las dos hidroxifucsonas objeto de estudio en este traba-

jo; ligeramente inferior, en el caso del éster fosfórico de la benzaurina, pero de modo bastante acusado en el caso del éster correspondiente a la aurina. Este último es muy similar al rosolilfosfato sódico, por sus propiedades, aplicaciones y bicromogenismo propio de la aurina, como derivado metilado de esta última que es el ácido rosólico, dando asimismo la aurina disoluciones amarillas en medio ácido y rojas en medio alcalino, si bien su zona de viraje se halla comprendida entre los pH 6 y 7, con color rojo de máxima intensidad a pH del orden de 7,5. En cambio la benzaurina, además de la mayor velocidad de hidrólisis del éster correspondiente, ofrece la ventaja indiscutible de su bicromogenismo, rojo escarlata claro, en medio ácido, y violeta rojizo intensísimo, en medio alcalino, dentro de una zona de viraje comprendida entre límites de pH similares a los del ácido rosólico (6,9-8). Dicho bicromogenismo se destaca con claridad manifiesta y permite efectuar determinaciones fotométricas en las mejores condiciones, aun directamente, en medios tan complejos como los de los líquidos biológicos. En cambio los ésteres fosfóricos de los colorantes monohidroxiazóicos obtenidos por nosotros, son de color verde en medio alcalino, virando al amarillo muy pálido en medio ácido, a diferencia de los ésteres de las hidroxifusiones estudiadas, que no dan viraje alguno mientras permanecen inalterados. Pero además los colorantes hidroxiazóicos correspondientes viran en general del amarillo al rojo claro, en medio ácido, y del amarillo rojizo al rojo vinoso intenso en medio alcalino, de modo que se observan varios virajes durante la hidrólisis de los ésteres respectivos, desde el verde al rojo, operando en medio alcalino, y desde el amarillo muy pálido al rojo claro, operando en medio ácido, dependiendo la intensidad y tono del color de la concentración del colorante liberado durante el proceso hidrolítico.

Un caso curioso de hidrólisis fosfatásica más rápida que la del fenoltaleinfofato sódico, pero de proceso más lento que el de otros ésteres fosfóricos de los colorantes monohidroxiazóicos estudiados, aunque sin embargo igualmente rápida en su fase inicial, la ofrece el éster, 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico, que hemos obtenido copulando la sal de diazonio de la sulfanilamida con el fenilfosfato sódico. Tal efecto puede interpretarse en nuestro concepto como una posible acción inhibidora sobre el proceso fosfatásico, a medida que aumenta en el sistema la concentración del amidosulfonilbenceno-azo-fenol liberado, mayormente teniendo en cuenta que la sulfanilamida inhibe algunos procesos fosfatásicos, conforme han observado Z. B. Miller, J. Waldman y F. C. McLean en la fosfatasa ósea (8); pero no sólo la sulfanilamida, sino que incluso la sulfanilamidopiridina y el sulfanilamidotiazol, lo mismo que el propio ácido sulfanílico, determinan una fuerte acción inhi-

bidora sobre la fosfatasa del suero, estudiada por Lora Tamayo y Tallada (6). Hechos éstos concordantes con nuestras observaciones experimentales en el caso del éster amidosulfonibenceno-azo-fenilfosfórico, que no obstante constituir una especie química dis-



Gráfica n.º 1

tinta de las mencionadas, tiene de común con ellas el hecho de tratarse de un derivado sulfanilamídico.

En la primera rama de la gráfica que se incluye adjunto, se observa claramente la inhibición provocada por el amidosulfonibenceno-azo-fenol liberado, a medida de su formación, empleando como fuente de fosfatasas un autolizado de intestino de rata blanca en 300 veces su peso de agua clorofórmica, en la mezcla amortiguadora de carbonato-bicarbonato sódicos ($\text{pH}=9,4$) propuesta por King (4). El éster 4,4'-amidosulfonibenceno-azo-fenilfosfórico, producto de copulación de la sal de diazonio de la sulfanilamida con el fenilfosfato sódico, lo utilizamos como sustrato, previamente disuelto en dicha mezcla amortiguadora, partiendo de una diso-

lución M/250 recién preparada y en la que existe evidentemente en forma de sal sódica, dado el pH del medio. La introducción en el sistema de cantidades variables de amidosulfonilbenceno-azo-fenol, previa adición de dicha substancia obtenida separadamente por copulación de la sal de diazonio de la sulfanilamida con el fenol, determina asimismo una acción inhibidora intensa, que no se registra en la gráfica de referencia por considerarla suficientemente demostrativa al efecto. Conforme se observará, figuran en ella como abscisas los valores de las lecturas fotométricas directas (se empleó un fotocolorímetro Evans, con filtro azul) y como ordenadas el tiempo en segundos. Se operó a la temperatura ambiente de 15,5°C.

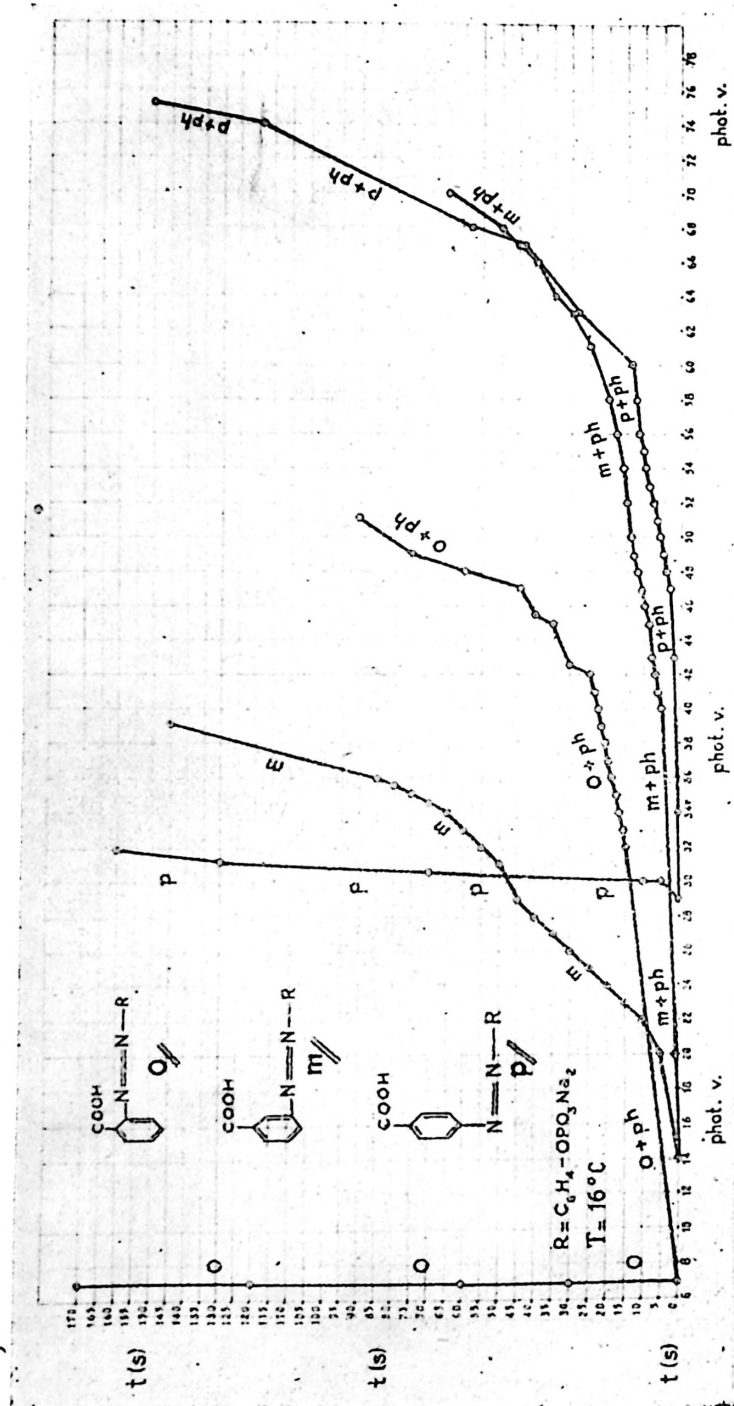
Y un hecho aparece clarísimamente en la indicada gráfica como consecuencia de la introducción en el sistema fosfatásico del ácido *para*-aminobenzoico, a saber: la rápida evolución del desarrollo de color que determina la adición de dicho ácido, que se muestra como un activador poderoso, según puede observarse a partir de la línea de trazos paralela al eje de abscisas. Este hecho concuerda perfectamente en nuestro concepto con la teoría de Sevag (12) para explicar la acción antagónica de los derivados sulfanilamídicos ejercida por el ácido *para*-aminobenzoico, fundada en su mayor tendencia a desplazar a aquéllos de las superficies en las que se hallan adsorbidos. De este modo el amidosulfonilbenceno-azofenol adsorbido por la fosfatasa a medida de su formación hidrolítica, sería liberado de la misma por el ácido *para*-aminobenzoico, que quedaría así retenido en su lugar, adsorbido por la fosfatasa, recuperando ésta entonces su actividad.

Estabilidad de los ésteres aroil-azo-fenilfosfóricos.

La estabilidad de los ésteres aroil-azo-fenilfosfóricos, depende de dos causas fundamentales, a saber: su tendencia a desprender nitrógeno, con formación de precipitados amorfos, de color amarillento, prácticamente insolubles en medios ácidos o alcalinos débiles, cuyo estudio carecía de interés para nuestro objeto, y su tendencia a la hidrólisis en ausencia de fosfatasa, debida principalmente a la influencia del pH del medio en que ocurren los procesos fosfatásicos.

Ambas causas de inestabilidad, carecen prácticamente de importancia respecto a la velocidad de hidrólisis extraordinaria de los mismos bajo la acción de las fosfatasa, sobre todo previa elección de la temperatura de incubación adecuada, según la estabilidad del éster aroil-azo-fenilfosfórico a emplear como sustrato (*).

(*) Contrasta de modo extraordinario la facilidad de hidrólisis de estos ésteres aroil-azo-fenilfosfóricos con la muy lenta del monofenilfosfato neutro de bario, estudiada detalladamente por A. Desjoberi (Tesis Doct. Ciencias, París 1950), según comunicación privada del autor, al que nos es muy grato reiterar aquí nuestro agradecimiento.



Gráfica n.º 2

Estos hechos se observan claramente en las gráficas que se incluyen adjunto referentes a las velocidades de hidrólisis de los ésteres fosfóricos obtenidos respectivamente por copulación de las sales de diazonio de los ácidos *orto*, *meta* y *para*-aminobenzoicos con el fenilfosfato sódico, operando en condiciones idénticas a las de la gráfica número 1 referente al éster amidosulfonilbenceno-azo-fenil-fosfórico, incluida precedentemente.

Las gráficas señaladas con las letras *o*, *m*, *p*; corresponden a los ésteres respectivos, en presencia de fosfatasa inactivada, previa calefacción a ebullición. Las señaladas con las mismas letras + *ph*, se obtuvieron en condiciones operatorias idénticas, salvo sustituir la fosfatasa inactivada por fosfatasa activa.

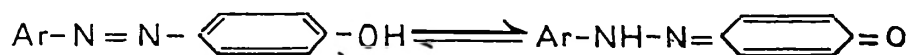
Como abscisas figuran los valores de las lecturas fotométricas directas y como ordenadas el tiempo en segundos. De la extraordinaria rapidez de los procesos hidrolíticos correspondientes, lo mismo que de las diferencias manifiestas de comportamiento existentes entre estos tres isómeros, ofrecen un ejemplo suficientemente demostrativo las indicadas gráficas.

De los tres ésteres isómeros, el derivado *orto* es el que se muestra por completo estable, operando en presencia de fosfatasa inactivada. En cambio en presencia de fosfatasa activa, se hidroliza con rapidez extraordinaria, según se aprecia claramente en la gráfica correspondiente.

Y esta estabilidad del derivado *orto* en ausencia de fosfatasa activa, contrasta poderosamente con la inestabilidad de los otros dos isómeros, en igualdad de condiciones.

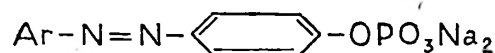
Discusión

Conforme se habrá observado, los ésteres aroil-azo-fenilfosfóricos obtenidos por nosotros se caracterizan precisamente por su labilidad extraordinaria. Dicha propiedad, a la que obedece sin duda la dificultad de síntesis de estos ésteres por fosforilización directa, parece confirmar la hipótesis generalmente admitida en la actualidad, según la cual se considera a los compuestos *p*-hidroxiazóicos, como constituidos por dos formas diferentes, en equilibrio azo-quinónico (2):



Pero en general con una mayor tendencia a la preponderancia de la forma quinónica, en nuestro concepto, puesto que permite interpretar la labilidad extraordinaria de los ésteres fosfóricos correspondientes, observada por nosotros; habida cuenta de que a

los productos de copulación de las sales de diazonio con el fenilfosfato sódico les corresponde la estructura :



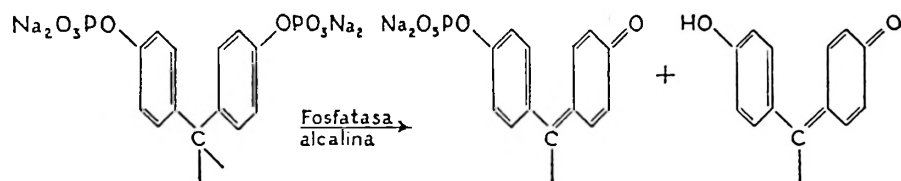
que hemos confirmado experimentalmente, conforme expoundremos en otros trabajos en curso.

De acuerdo, pues, con lo expuesto, la hidrólisis enzimática ocurrirá con predominio de la tendencia del colorante hidroxiazoico a pasar a la forma quinónica, a expensas del hidróxilo fenólico y, por lo tanto, de la estabilidad del éster fosfórico correspondiente ; propiedad ésta de la que también participa el fenolftaleínfosfato sódico bajo la acción de la fosfatasa alcalina, mediante su hidróxilo lábil en las condiciones en que la misma actúa.

Pero no sólo esta interpretación es aplicable a los colorantes *para*-hidroxiazoicos, sino que incluso el propio fenolftaleínfosfato sódico ofrece, en nuestro concepto, otra confirmación experimental de lo expuesto, dado que la fenolftaleína participa también de una propiedad en cierto modo de tipo similar a la tautomería ceto-enólica, según el pH del medio ; pudiendo explicarse asimismo su velocidad de hidrólisis fosfatásica como una confirmación de la tendencia predominante del compuesto a pasar a la forma quinónica, estable bajo la acción de la fosfatasa alcalina, por lo menos en las condiciones de pH del medio ; todo lo cual ha de ocurrir a expensas de la estabilidad del hidróxilo transformable en el grupo carbonilo quinónico ; lo que repercutirá evidentemente en la mayor labilidad del resto fosfórico correspondiente a dicho hidróxilo, respecto al resto fosfórico unido al otro hidróxilo fenolftaleínico netamente fenólico y que es equivalente al de la benzaurina, ya que en su forma coloreada puede considerarse la fenolftaleína, conforme es sabido, como un derivado carboxílico de la benzaurina, o sea como una monohidroxifucsona. Por lo tanto, la velocidad de hidrólisis del éster fosfórico de la benzaurina, algo menor respecto a la del éster fosfórico fenolftaleínico, resulta explicable si se considera que el desarrollo de color en este último depende sobre todo de la escisión hidrolítica del resto fosfórico unido al hidróxilo lábil transformable en grupo quinónico. En cambio en los ésteres fosfóricos de los colorantes monohidroxiazoicos estudiados, el único resto fosfórico existente por molécula de cromógeno se halla unido, precisamente, a un hidróxilo lábil, también transformable en grupo quinónico.

El proceso de escisión hidrolítica del fenolftaleínfosfato sódico bajo la acción de la fosfatasa alcalina, ocurre por lo tanto en un medio en que por predominar la tendencia a la estabilidad de la forma roja, resulta evidentemente disminuída la estabilidad del

resto fosfórico unido al hidróxilo lábil en dichas condiciones, debiendo, por lo tanto, transcurrir inicialmente en nuestro concepto dicho proceso del modo siguiente:



Así, pues, la velocidad de hidrólisis fosfatásica de los substratos cromógenos, dependerá principalmente de la posibilidad de existencia del colorante correspondiente en formas tautómeras o desmótopas que afecten al hidróxilo fosforilizado, siempre que su tendencia a la pérdida del hidróxilo se halle favorecida por las condiciones de pH del medio, que determinan la tendencia del sistema al predominio de la forma más estable. Y esto es precisamente lo que ocurre en los medios biológicos, puesto que las actividades enzimáticas no sólo dependen, como es sabido, de la naturaleza propia de cada fermento y de la del medio en que actúa, sino principalmente de la del substrato.

En la aplicación de los colorantes hidroxiazoicos para el estudio de las fosfatasa, empleados por primera vez al efecto, coinciden con nosotros, aunque trabajando en otra dirección, mediante técnicas, procesos y métodos completamente distintos, Arnold M. Seligman y Leon H. Manheimer, en un trabajo aun reciente (11), quienes dan un nuevo método para la demostración histoquímica de la fosfatasa ácida.

Se funda dicho método en el empleo de sales de diazonio estables a la temperatura ambiente sin descomposición excesiva durante veinticuatro horas, como la correspondiente a la 1-amino antraquinona, rápidamente copulable con el *alfa*-naftol en dichas condiciones, operando a pH 5.

Los cortes histológicos debidamente preparados al efecto en la forma expuesta por ambos autores, se introducen en una disolución que contiene esencialmente *alfa*-naftilfosfato cálcico y el cloruro de antraquinondiazonio, en presencia de una mezcla amortiguadora de acetato sódico y de ácido acético para mantener el medio a pH 5 durante el proceso.

La notable estabilidad del cloruro de antraquinón-1-diazonio en disolución acuosa, hace posible, según los autores, la incubación de los tejidos en estudio, a temperaturas del orden de los 35°C., aunque sin embargo la descomposición del mismo que conduce al derivado hidroxílico, es entonces más intensa, aumen-

tando en consecuencia el desarrollo de color amarillo. Los mejores resultados los obtienen incubando a la temperatura ambiente o algo inferior (6°C.), aunque en este último caso aumenta el tiempo necesario para la incubación.

Incubados los cortes histológicos, la fosfatasa ácida de los tejidos estudiados actúa, según dichos autores, hidrolizando el *alfa*-naftilfosfato cálcico, y el *alfa*-naftol liberado se va copulando a medida de su formación con el cloruro de antraquinondiazonio, dando el azocolorante correspondiente que tiñe la preparación histológica en rojo oscuro, con intensidad variable en diversas zonas de la misma, dependiente de su riqueza en fosfatasa. De este modo es posible obtener las microfotografías del tejido estudiado y observar la distribución de fosfatasas en el mismo.

Aparte de la hipótesis de dichos autores, cabe sin embargo suponer, de acuerdo con nuestros resultados experimentales, cuando menos en los casos estudiados por nosotros, que en el mismo medio de incubación utilizado por ellos, se copule inicialmente el ácido *alfa*-naftilfosfórico con el cloruro de antraquinondiazonio, dando el azo-compuesto respectivo, con seguridad de coloración distinta, probablemente amarilla, por el efecto batócromo que determina según nuestros ensayos la presencia del resto fosfórico, conforme hemos podido observar experimentalmente en todos los casos que hemos estudiado. Al actuar la fosfatasa sobre dicho compuesto, eliminando hidrólicamente el resto fosfórico con liberación del antraquinon-azo-naftol, pasa la coloración del líquido de incubación del amarillo al rojo oscuro, en la forma indicada por los autores de referencia.

El desarrollo del color amarillo que los mismos observan durante el proceso, lo atribuyen, en cambio, a descomposición de la sal de diazonio, con liberación del derivado hidroxilado correspondiente. Tales descomposiciones, observadas también por nosotros en algunos casos expuestos en este trabajo, pueden ocurrir simultáneamente con el proceso normal de copulación, sobre todo atendiendo a las condiciones operatorias fundamentales del referido método de demostración histoquímica de la fosfatasa ácida.

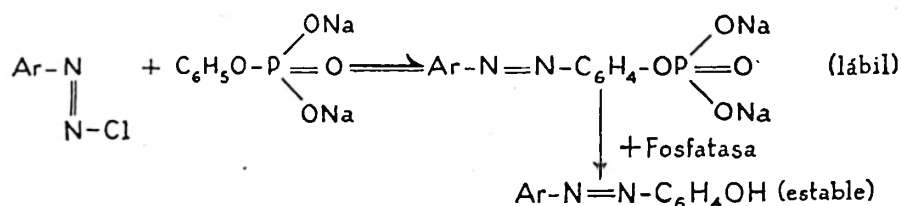
Por otra parte, al copular la sal de diazonio del ácido *orto*-aminobenzoico con el fenilfosfato sódico, no se observan síntomas de actividad reaccionante, a juzgar por la débil coloración amarillo-pálida de la disolución resultante, que en medio ácido permanece casi incolora. En medio alcalino la intensidad del color amarillo no es mucho mayor. En nuestro concepto y debido al impedimento estérico de los derivados *orto*, la sal de diazonio indicada se comporta, frente al fenilfosfato sódico, como una de las sales de diazonio estables o estabilizadas de las empleadas por Seligman, Nachlas y Manheimer (11 y 10). Y según estos auto-

res, el proceso de hidrólisis enzimática ocurriría atacando la fosfatasa al fenilfosfato sódico (fosfatasa alcalina de intestino de rata blanca en nuestro caso) y el fenol así liberado sería el que en realidad se copularía con la sal de diazonio del ácido *orto*-aminobenzoico, a medida de su formación, con el desarrollo del color correspondiente al compuesto hidroxiazóico resultante y ello obligaría a emplear directamente en las investigaciones fosfatásicas la disolución resultante de la mezcla de las disoluciones de la sal de diazonio y del fenilfosfato sódico a copular, puesto que en tal caso la inestabilidad de la primera impediría aislarla en estado sólido sin descomposición, a diferencia de las sales de diazonio empleadas por los indicados autores, perfectamente obtenibles en estado sólido.

A excepción del éster amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico y del 4,4'-sulfónico-azobenceno-fosfórico, perfectamente obtenibles en estado sólido y muy estables en ausencia de humedad, los restantes, derivados de otros compuestos hidroxiazóicos igualmente estudiados por nosotros, a saber: los tres ésteres fosfóricos isómeros (2, 3 y 4), 4'-carboxil-azobencenofosfóricos, resultantes de los ácidos aminobenzoicos isómeros correspondientes; el éster fenil-azo-fenilfosfórico y el *meta*-toluil-azo-fenilfosfórico, deben emplearse directamente en disolución, a concentraciones aproximadas, a causa de la dificultad de aislarlos sin descomposición.

Utilizamos por lo tanto directamente las disoluciones de los mismos, tal como resultan de la copulación de las disoluciones de las sales de diazonio correspondientes, con el fenilfosfato sódico, operando conforme se expone detalladamente en otros trabajos en curso. Técnicas que no ofrecen dificultad alguna para practicarlas operando en identidad de condiciones experimentales, con fines de ensayos comparativos. Por otra parte, al preparar las disoluciones de dichos substratos, es probable continúe en forma de sal sódica el resto fosfórico al pasar a formar parte del compuesto azóico resultante, puesto que se opera en medio alcalino al proceder a la copulación, y además aplicamos los substratos bicromógenos correspondientes, con el fin de estudiar los procesos enzimáticos con fosfatasa alcalina, en cuyas condiciones no existe riesgo alguno de inhibición provocada por vestigios de ácido nitroso libre, estudiada detalladamente por C. Anagnostopoulos (1). Pero aun en el caso de las fosfatasas ácidas, resultaría fácil eliminar previamente del sistema todo vestigio de ácido nitroso libre, arrastrándolo mediante intenso burbujeo de un gas inerte a través de las disoluciones de los ésteres aroil-azo-aroilfosfóricos correspondientes, mantenidas a la temperatura más conveniente en cada caso, según la estabilidad del compuesto en disolución.

Es pues muy probable que en la disolución obtenida al copular la sal de diazonio del ácido *orto*-aminobenzoico con el fenilfosfato sódico, existan ambos componentes inalterados. El hecho de que la misma sea atacada por la fosfatasa con liberación del ácido 4,2'-oxiazobenceno carboxílico, que comunica al líquido un color amarillo intenso, no es contrario a la hipótesis de Selligman, Nachlas y Manheimer, antes mencionada, puesto que cabe suponer, en efecto, que la fosfatasa actúe sobre el fenilfosfato sódico directamente y el fenol resultante se vaya copulando con la sal de diazonio, a medida de su formación; pero un hecho se opone, en nuestro concepto, a tal hipótesis y es que el ataque de la fosfatasa es rapidísimo, puesto que operando en general a las concentraciones usuales de substrato y fosfatasa, el proceso se completa a la simple temperatura ambiente o inferiores en un tiempo del orden de los dos minutos; observándose ya el efecto, por el desarrollo de color correspondiente, a los pocos segundos de iniciado el proceso. Este comportamiento, por completo similar al observado por nosotros en los demás ésteres aroil-azo-fenilfosfóricos estudiados, excluye en nuestro concepto toda posibilidad de acción directa de la fosfatasa alcalina sobre el fenilfosfato sódico, puesto que en tal caso el proceso ocurriría en otras condiciones muy diferentes. La única interpretación posible de los hechos expuestos nos induce a considerar que en el sistema resultante de mezclar la disolución de la sal de diazonio con la del fenilfosfato sódico, operando en medio alcalino, no sólo existirán ambos componentes inalterados, sino incluso el éster aroil-azo-fenilfosfórico, producto de la copulación, aunque su concentración en la mezcla, siempre pequeña, dependerá de la mayor o menor actividad reaccionante de la sal de diazonio frente al fenilfosfato sódico; de las concentraciones respectivas de ambos; de la temperatura y del pH del medio. Se alcanzará, por lo tanto, un estado de equilibrio, dependiente de dichos factores, cuyo desplazamiento bajo la acción de la fosfatasa ocurrirá evidentemente en el sentido de la formación del éster fosfórico azoico correspondiente, por ser el componente más lábil del sistema:



Esta interpretación es también aplicable a las fosfatasas ácidas, conforme será fácil comprender, puesto que entonces tan

sólo variará la concentración del éster fosfórico azoico presente en el sistema, como consecuencia de la disminución del pH del mismo, dada la conocida influencia ejercida por las condiciones de pH del medio en toda clase de copulaciones de este tipo. Es en nuestro concepto, asimismo válida, cuando se opera con sales de diazonio estables o estabilizadas, en las condiciones descritas por Seligman, Nachlas y Manheimer (11 y 10), que han sido ya objeto de atención en otro lugar de este trabajo. Respecto a los isómeros *meta* y *para*, cuyas estructuras figuran asimismo en la gráfica número 2, su diferente estabilidad, muy acentuada por cierto, como consecuencia de su distinta tendencia a la hidrólisis en ausencia de fosfatasa activa, bajo la sola acción del pH del medio a una temperatura determinada, guarda cierta relación en nuestro concepto con la estabilidad de los ésteres 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico y 4,4'-sulfónico-azobenceno-fosfórico, observada por nosotros y debida sin duda al mayor carácter ácido que determinan los restos amidosulfonilo y sulfónico, unidos a sus respectivos núcleos bencénicos, por su mayor tendencia a la compensación del efecto análogo, ejercido en sentido contrario por el resto fosfórico.

Pero aparte las consideraciones expuestas, el factor fundamental a tener en cuenta para el empleo como sustrato de los ésteres aroil-azo-aroilfosfóricos, es la temperatura, ya que dentro de los límites de concentración y de pH requeridos por los procesos fosfatásicos, la estabilidad de nuestros sustratos cromógenos azóicos depende esencialmente de la temperatura, de tal modo que las temperaturas de los procesos correspondientes a todas las gráficas que se incluyen en este trabajo, con la sola excepción de la obtenida mediante el amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfato sódico, estable a temperaturas muy superiores, se hallan comprendidas dentro del límite de estabilidad de los mismos en relación con su utilidad práctica, puesto que la temperatura a elegir para cada sustrato cromógeno azóico dependerá evidentemente de la diferencia existente en cada instante dado entre su velocidad de hidrólisis fosfatásica y su velocidad de hidrólisis, bajo la sola acción del pH del medio, en presencia de fosfatasa inactivada y tanto si ambos procesos ocurren o no con desprendimiento simultáneo de nitrógeno, ya que se trata en tal caso de una reacción secundaria, dada su escasa intensidad respecto al proceso hidrolítico fundamental. Cuanto mayor sea la diferencia entre dichas velocidades a una temperatura máxima determinada, tanto mayor será el margen de comparación fotométrica de las intensidades de los sucesivos desarrollos de color respectivos a la misma temperatura y, por lo tanto, el campo de aplicación práctica del sustrato cromógeno azóico correspondiente; todo

lo cual se observa claramente en las gráficas incluídas en el presente trabajo.

En todos los casos en que se empleen directamente las disoluciones resultantes de copular las sales de diazonio con los arilfosfatos, se hallará además siempre presente evidentemente, aún en cantidades muy exiguas, el otro isómero de posible formación, que operando con el fenilfosfato sódico, es el isómero *orto*, también hidrolizable enzimáticamente y sin ofrecer por lo tanto inconveniente alguno, mayormente dada su pequeña concentración en el sistema.

Trabajando con un ligero exceso de sal de diazonio se copulará todo el arilfosfato y quedará dicho ligero exceso de sal de diazonio inalterada sin influencia alguna sobre el proceso fosfatásico.

Resumen

Se estudia comparativamente con el fenolftalein fosfato sódico la hidrólisis enzimática de las sales sódicas de los ésteres fosfóricos de la aurina y de la benzaurina, así como la de los ésteres fosfóricos del ácido 4,4'-hidroxi-azobenceno-sulfónico, del 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenol, del 3,4'-toluil-azo-fenol, del 4'-fenil-azo-fenol y la de los ésteres isómeros (2, 3 y 4), 4'-carboxil-azobenceno-fosfóricos; estos últimos comparativamente entre ellos y salvo el éster fenolftaleínico, se describen todos por primera vez.

Se exponen algunas aplicaciones prácticas de los mismos referentes a la acción antagónica ejercida por el ácido *para*-aminobenzoico sobre el amidosulfonilbenceno-azo-fenol, formado en la hidrólisis enzimática del éster 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico y al comportamiento hidrolítico de los ésteres isómeros de referencia.

Summary

A comparative study is made with sodium phenolphthalein phosphate on the enzymatic hydrolysis of the sodium salts of the phosphoric esters of aurine and benzaurine, as well as of that of the phosphoric esters of 4,4'-hydroxy-azobenzene-sulphonic acid, of 4,4'-amidosulphonylbenzene-azo-phenol, of 3,4'-tolil-azo-phenol, of 4'-phenyl-azo-phenol, and of that of the isomeric esters (2, 3 and 4), 4'-carboxyl-azobenzene-phosphoric, these latter comparatively among each other and, excepting phenolphthaleinic ester, all are described for the first time.

There are exposed some practical applications of same referring to the antagonistic action exercised by *para*-aminobenzoic acid on amidosulphonylbenzene-azo-phenol formed in the enzymatic hydrolysis of ester 4,4'-amidosulphonylbenzene-azo-phenylphosphoric and to the hydrolytic conduct of the isomeric esters referred to.

Bibliografía

- (1) ANAGNOSTOPOULOS, C. : *Biochimica et Biophysica Acta*, **4**, 587-588 1950.
- (2) GILSON, A. : *Traité Chim. Org.* (V. Grignard), **15**, 340-342 (Masson, Paris, 1948).
- (3) KING, E. J., y ARMSTRONG, A. R. : *Canad. Med. Assoc. J.* **31**, 376 1934.
- (4) KING, E. J. : «Microanálisis bioquímicos en medicina», versión española, pág. 75 (Editorial Científico Médica, Barcelona, 1948).
- (5) KING, E. J. : *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **55** (3), 311-314 1943 ; SOLS, A. y MONCHE, J. : *VIII^o Congrès de Chimie Biologique*, Paris 1948 ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 161-165 1949.
- (6) LORA TAMAYO, M. y TALLADA, F. : *Anales R. Sdad. Esp. Fis. Quím.* **40**, 1322-1327 1944.
- (7) MARTLAND, M. HAUSMAN, F. y ROBINSON, R. : *Biochem. J.*, **18**, 1152 1924 ; KAY, H. D. : *Biochem. J.*, **20**, 791 1926.
- (8) MILLER, Z. B., WALDMAN, J. and Mc. LEAN, F. C. : *Nature*, **161**, 273-274 1948.
- (9) MONCHE, J. : *Anales R. Sdad. Esp. Fis. Quím.* **44** (B), 608-611 1948.
- (10) NACHLAS, MARVIN, M., and SELIGMAN, ARNOLD, M. ; *Journ. of the Nat. Cancer Institute*, **9**, 415-425 1949.
- (11) SELIGMAN, ARNOLD, M., and MANHEIMER, LEON, H. : *Journ. of the Nat. Cancer Institute*, **9**, 427-434 1949.
- (12) SEVAG, M. G. : *Adv. Enzymol.*, **6**, 33 1946.

