

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

Estudio sobre el comportamiento de substratos cromógenos para fosfatasas, según el pH del medio

por J. Monche

(Recibido para publicar el 28 de noviembre de 1951)

La mayoría de trabajos publicados hasta el presente sobre fosfatasas y que han servido de base para contribuir al conocimiento de las mismas, se han efectuado «in vitro», o sea en condiciones operatorias que distan mucho de permitir un mínimo de comparabilidad con las condiciones en que actúan estos fermentos en los medios internos biológicos del organismo. Lo que pudiéramos denominar la práctica de la bioquímica en el tubo de ensayo, ha conducido y conduce, en nuestro concepto, a una visión totalmente parcial de este tipo de problemas y, por lo tanto, sujeta en gran parte a continua revisión, a medida que aumentan las posibilidades de la investigación.

En un trabajo anterior (2), nos hemos ya ocupado de la influencia decisiva ejercida por la constitución química de los ésteres empleados como substrato, no sólo respecto a la velocidad de su hidrólisis bajo la acción de las fosfatasas, sino en la marcha general del proceso fosfatásico correspondiente; influencia puesta aún más de manifiesto si se tiene en cuenta que las condiciones óptimas de pH del medio varían considerablemente de unos substratos a otros, de tal modo que la influencia del pH del medio sobre la velocidad y la marcha general de los procesos fosfatásicos debe atribuirse principalmente, en nuestro concepto, al aumento de la tendencia del substrato a hidrolizarse a un determinado pH óptimo, bajo la sola acción del mismo, puesto que, conforme es sabido, la hidrólisis de los ésteres constituye un proceso reversible, sujeto a la acción catalítica ejercida por los hidrogeniones e hidroxiliones presentes en el medio en que el proceso ocurre.

De acuerdo con lo expuesto, las esterasas deben, pues, comportarse, en realidad, no ya como agentes catalíticos propiamente

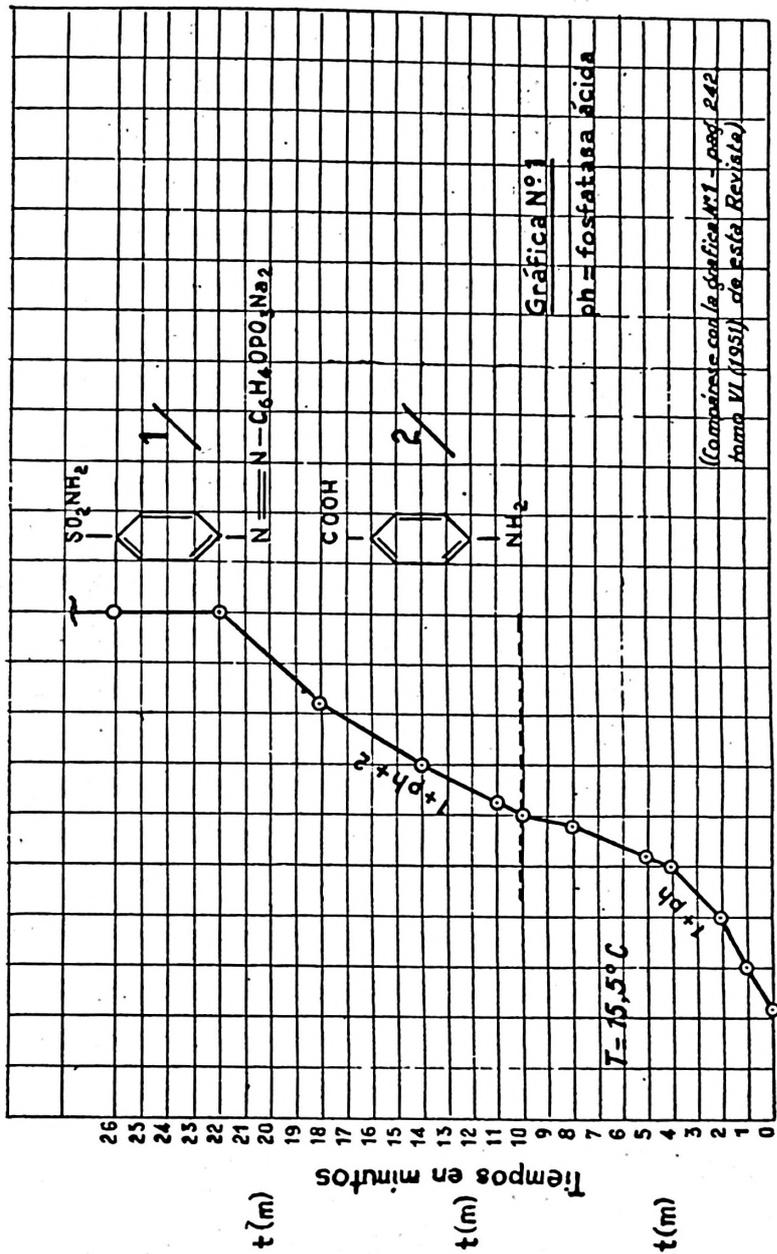
dichos, sino como verdaderos activadores de un proceso de hidrólisis ya de por sí catalizado gracias al pH medio. Interpretación ésta por lo menos concordante con las condiciones extremas de pH del medio en que se realiza habitualmente la práctica experimental de estos procesos en el laboratorio, empleando los substratos corrientes en esta clase de trabajos.

Parte experimental

En un trabajo anterior (2) hemos estudiado las velocidades de hidrólisis enzimática de nuevos ésteres aril-azo-arilfosfóricos bajo la acción de la fosfatasa alcalina, comparativamente con la del fenoltaleinfosfato sódico, en condiciones similares, siendo muy notable el hecho de la extraordinaria velocidad hidrolítica de aquéllos, sin parangón posible con la de este último. Quedaba, pues, por ensayar el comportamiento de los indicados ésteres sometidos a la acción de la fosfatasa ácida, que los hidroliza, en cambio, con lentitud manifiesta, a la temperatura ambiente, hasta el extremo de ser completamente imprecisas las determinaciones fotométricas correspondientes, dada la inestabilidad de dichos azoicos, de la que ya nos hemos ocupado en el referido trabajo.

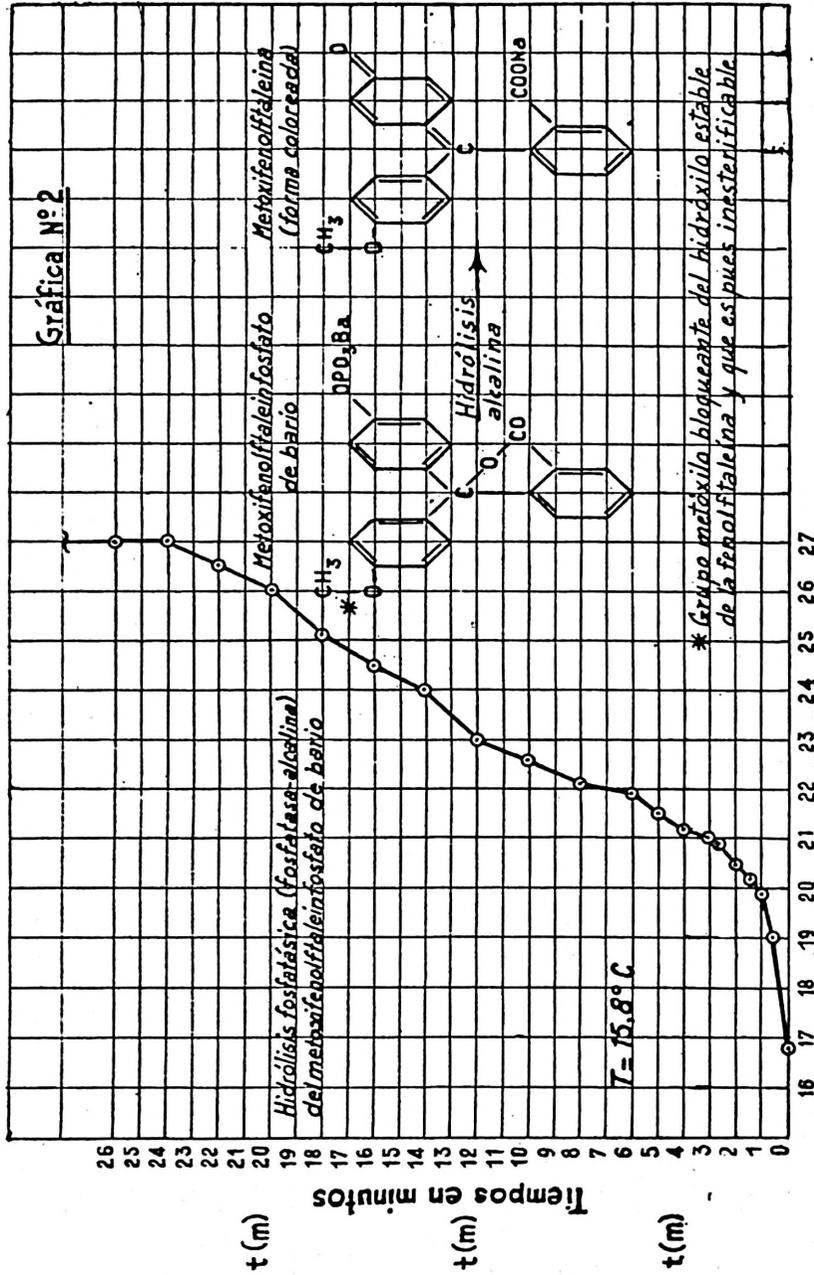
Sin embargo, y habida cuenta de la estabilidad del éster 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico, en medio ácido y alcalino, respecto a los demás azoicos de este tipo estudiados por nosotros en dicho trabajo, hasta el extremo de ser incluso obtenible fácilmente en estado sólido, sin inconveniente alguno, conforme hacemos constar en otra publicación (3), hemos considerado interesante estudiar su comportamiento frente a la fosfatasa ácida, y los resultados obtenidos se observarán en la gráfica número 1; habiendo operado al efecto dentro de la mayor identidad de condiciones experimentales respecto a otra gráfica similar incluida en el trabajo de referencia, pero sustituyendo esta vez la fosfatasa alcalina por la ácida del salvado de trigo, en la mezcla amortiguadora de acetato sódico y ácido acético de Michaelis y Krüger, llevada a $\text{pH} = 5,2$. Hemos empleado un preparado puro de dicha fosfatasa, obtenido según el método de extracción acuosa y precipitación final por acetona, de Fleury, Courtois y colaboradores (1).

Asimismo, y por las razones que expondremos más adelante, hemos estudiado la hidrólisis fosfatásica del metoxifenoltaleinfosfato de bario, con los resultados que se deducirán del examen de la gráfica número 2.



phot. v
Valores fotométricos
phot. v

Gráfica N° 2



phot.v

Valores fotométricos

phot.v

El metoxifenoltaleinfosfato de bario, lo hemos obtenido partiendo de la metoxifenoltaleína, resultante esta última de la metilación de la fenoltaleína con sulfato dimetílico. Para su fosforilización hemos seguido, en líneas generales, la misma técnica que para la fenoltaleína; transformando finalmente la sal sódica resultante, difícil de aislarla en suficiente estado de pureza, en la sal de bario correspondiente, que precipita muy bien por simple tratamiento con acetato de bario (3).

La gráfica número 2 la hemos obtenido operando con una dispersión de fosfatasa alcalina purificada de intestino de perro, partiendo de 1 c.c. (1 c.c. = 0,02 g.) de una disolución madre de dicho enzima, para diluirla en un matraz aforado de 10 c.c., hasta el enrase, con la mezcla amortiguadora de glicocola y sosa cáustica de Sörensen llevada a pH = 9,4 y separar 5 c.c. de la dispersión resultante (5 c.c. = 0,01 g. de preparado fosfatásico), para mezclarlos con 5 c.c. de una disolución M/25 del metoxifenoltaleinfosfato de bario en la misma mezcla amortiguadora y proceder inmediatamente al examen fotométrico.

Discusión

En la gráfica número 1 se observa claramente la disminución extraordinaria de la velocidad de hidrólisis fosfatásica en medio ácido del éster 4,4'-amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico (*), así como el efecto mucho menor producido por la introducción en el sistema del ácido *para*-aminobenzoico, todo lo cual constituye en nuestro concepto una clara demostración de la mucha menor tendencia a la hidrólisis que muestra dicho éster en medio ácido y que debe, pues, atribuirse a resultar favorecida la tendencia al predominio de la forma azo en el equilibrio azo-quinónico del colorante monohidroxi-azoico, o sea del amidosulfonilbenceno-azo-fenol liberado por hidrólisis; todo ello de acuerdo con nuestras previsiones teóricas (2).

En cuanto a la gráfica número 2, se observa claramente la velocidad de hidrólisis extraordinaria del metoxifenoltaleinfosfato de bario, bajo la acción de la fosfatasa alcalina, de tal modo que ni aun por la temperatura de incubación, existe parangón posible con la del fenoltaleinfosfato sódico sometido a la acción de la misma fosfatasa, ya que incluso aumentando la temperatura de incubación hasta los 37°, una vez terminado el proceso de hidrólisis del metoxifenoltaleinfosfato bórico a la temperatura ambiente, no se

(*) Sus disoluciones en medio ácido son prácticamente incoloras mientras que las del colorante liberado son de color amarillo canario intenso, pudiendo efectuarse sin dificultad alguna las determinaciones fotométricas.

completa éste más. En cambio, bajo la acción de la fosfatasa ácida, no se observan diferencias notables entre las respectivas velocidades hidrolíticas del metoxifenoltaleingosgato de bario y del fenoltaleinfosfato sódico en identidad de condiciones experimentales, operando a la temperatura de incubación de 37°, según ensayos efectuados.

Los hechos expuestos, tanto en el caso del éster azoico, como en el del metoxifenoltaleínico, demuestran claramente, en nuestro concepto, la importancia decisiva que debe atribuirse, al menos en ensayos de este tipo, a la constitución química del substrato empleado, como causa fundamentalmente determinante de las condiciones óptimas de acción de las fosfatasas, dada la influencia decisiva ejercida por el pH del medio en la estabilidad y demás propiedades de compuestos orgánicos polares, sobre todo de polaridad tan acusada como la de los ésteres fosfóricos; influencia esencialmente de tipo catalítico, conforme es sabido.

Y estos hechos son tanto más significativos en nuestro concepto, cuanto que permiten entrever la posibilidad de realización práctica experimental de procesos fosfatásicos trabajando a un pH próximo a 7, con tal de emplear como substrato ésteres fosfóricos muy lábiles en las condiciones extremas de pH usuales según las técnicas corrientes en los ensayos de laboratorio; todo lo cual tenemos actualmente en estudio, a fin de trabajar dentro de las condiciones de suavidad máxima, propias de los medios internos del organismo.

Resumen

Se estudia la hidrólisis fosfatásica del éster 4,4'-amido-sulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico bajo la acción de la fosfatasa ácida del salvado de trigo, así como la del metoxifenoltaleinfosfato de bario, sometido a la acción de la fosfatasa alcalina de intestino de perro.

Como continuación de estudios anteriores efectuados por el autor, se relacionan los hechos observados con la constitución química de los ésteres fosfóricos empleados como substrato, dada la influencia catalítica ejercida por el pH del medio sobre la estabilidad de los mismos.

Summary

A comparative study is made on the phosphatasic hydrolysis of the phosphoric ester of 4,4'-amidodisulphonylbenzene-azo-phenol under the action of acid phosphatase of the bran wheat, as same as the phosphatasic hydrolysis of the barium methoxyphenolphthalein phosphate under the action of alkaline phosphatase of dog intestine.

Following others similar studies previously accomplished by the author, all the observed facts are reported with the chemical constitution of the phosphoric esters acting as substrate, specially in connection with the catalytic influence of the pH of the medium on the stability of the sames.

Bibliografía

- (1) FLEURY, P., COURTOIS, J., ANAGNOSTOPOULOS, C. y DESJOBERT, A., *Bull. Soc. Chim. biol.*, **32**, 773, 1950.
- (2) MONCHE, J., *R. esp. Fisiol.*, **6**, 239-253, 1951.
- (3) MONCHE, J., «Algunas relaciones entre la constitución química y la velocidad de hidrólisis de substratos cromógenos para fosfatasas». — *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química*. — Serie B (en prensa).

