

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

## **Estudios sobre la aplicación de substratos cromógenos azoicos a la determinación cuantitativa de fosfatasas**

por **J. Monche y Magdalena Ferrer Arenillas**

---

(Recibido para publicar el 16 de abril de 1953)

Como consecuencia de los trabajos que venimos realizando desde hace tiempo sobre los ésteres fosfóricos de colorantes monohidroxi-azoicos, aplicados al estudio de las fosfomonoesterasas (1), ha quedado bien sentada el hecho del interés que reviste la disponibilidad de métodos de determinación analítica de las mismas, caracterizados por operarse en condiciones que sean lo más similares posible a las de los medios internos biológicos del organismo en que actúan dichos enzimas.

Si bien es ésta una meta difícil de alcanzar, dada la propia complejidad de la célula viva, no es menos cierto, en nuestro concepto, que cuanto más se aparten los métodos empleados para la determinación de fosfatasas, de las condiciones en que las mismas normalmente actúan, tanto más problemáticos y sujetos, por lo tanto, a revisión, serán los resultados obtenidos.

Con arreglo a este criterio (Monche), en favor del cual hemos aportado diversos hechos experimentales en trabajos anteriores (2) y que continuaremos desarrollando en otros que tenemos en preparación, estudiamos en el presente, con mayor detalle que lo hemos hecho hasta ahora, el comportamiento del éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, dadas las propiedades del mismo, estudiadas por uno de nosotros (1), con miras a sus posibles aplicaciones analíticas, como substrato para la determinación cuantitativa de fosfomonoesterasas.

### Material y métodos

A fin de no extendernos excesivamente en la exposición de hechos experimentales que nos han servido de base para llegar al estado actual de nuestros trabajos, nos concretaremos exclusivamente a los que estimamos más fundamentales y demostrativos, previa una selección cuidadosa de los mismos.

#### ÉSTER 2,4'-CARBOXIL-AZOBENCENO-FOSFÓRICO

Damos a continuación, detalladamente, la técnica de síntesis y aplicación de este substrato cromógeno, tal como la tenemos establecida hasta el presente. Conforme se recordará, lo obtenemos copulando la sal de diazonio del ácido antranílico (*orto*-aminobenzoico), con el fenilfosfato disódico (3).

*Sal de diazonio.* — Se pesan cuidadosamente 900 mgr. de ácido antranílico (0'0065 moles), que se deposita en un vaso de precipitados de paredes gruesas, de unos 100 c.c. de capacidad y de forma alta. Seguidamente se añaden 4 c.c. de ácido clorhídrico 5 N/. y se remueve y machaca bien con una varilla de vidrio el clorhidrato del ácido antranílico, que así resulta, procurando invertir en la operación un tiempo no inferior a un cuarto de hora, que es el mínimo necesario para asegurar la completa transformación de dicho ácido en clorhidrato, por conveniente disgregación de la masa de clorhidrato apelmazado formada.

Es fundamental el empleo de agua destilada en la preparación de todos los reactivos y del hielo, necesarios en esta clase de trabajos, salvo, naturalmente, el hielo utilizado para baños frigoríficos.

Hechas estas observaciones, sobre las que consideramos innecesario insistir aquí, se dispondrá, por lo tanto, de una nevera eléctrica, cuyos recipientes para obtención de hielo, se llenarán de agua destilada. Se machacan los cubitos de hielo resultantes, utilizando, al efecto, un mortero de vidrio, y se introducen en el vaso que contiene el clorhidrato, unos pequeños trozos de hielo (peso 10 gr., aproximadamente); hallándose, a su vez el vaso previamente colocado en un baño frigorífico de agua y hielo machacado.

Se tiene preparada, separadamente, una disolución de nitrito sódico al 10 % y, asimismo, otra de yoduro potásico de igual concentración. Con esta última se impregnan unas tiras de papel de filtro.

De la disolución de nitrito sódico se toman 5 c.c. (5 c.c. = 500 miligramos) y se va añadiendo muy lentamente, en tres porciones, con intervalos de cinco minutos entre cada adición, efectuada sobre la suspensión de clorhidrato del ácido antranílico y con continua

agitación, cuidando, además, que la temperatura de la mezcla reaccionante se mantenga entre cero y cinco grados centígrados, lo que es fácil de lograr, regulando la velocidad de adición del nitrito sódico, para realizarla durante un tiempo no inferior a un cuarto de hora, disponiendo del correspondiente termómetro.

Hacia el término de la adición de la última porción de la disolución de nitrito sódico, se procederá muy lentamente, gota a gota, agitando cada vez la mezcla reaccionante con la varilla de vidrio y haciendo toques mediante la varilla, sobre el papel de filtro impregnado de la disolución de yoduro potásico, hasta el preciso momento en que el papel se tiña débilmente de color pardo rojizo. Se interrumpe entonces la adición de la disolución de nitrito sódico, siempre sin dejar de agitar la mezcla reaccionante con la varilla de vidrio, y al cabo de dos o tres minutos se vuelve a repetir el toque de ensayo sobre el papel y, así sucesivamente, hasta persistencia de la reacción positiva con dicho papel impregnado de la disolución de yoduro potásico; en cuyo momento se da por terminada la adición de la disolución de nitrito sódico, o sea la diazoación. De ordinario, el primer toque será suficiente con un poco de práctica, para que quede terminada la operación.

El empleo del papel de engrudo de almidón yodurado, que se colorea de azul en tal caso, conforme es sabido (siempre que el almidón no tenga dextrina y otras impurezas excesivamente frecuentes), no ofrece ventaja alguna para nuestro objeto, sobre el papel impregnado de yoduro potásico.

La disolución de la sal de diazonio así formada, se deja reposar durante un cuarto de hora más y dará siempre la reacción positiva indicada, sobre el papel de yoduro potásico. En caso contrario, se le añadirá una gota de la disolución de nitrito sódico, mediante un capilar, hasta débil tinción muy tenue del papel de yoduro potásico, si bien dicho caso es improbable. Entonces se filtra seguidamente, la disolución de la sal de diazonio a través de un filtro de pliegues de papel de filtro, sobre un matraz aforado de 25 c.c., dispuesto previamente en un baño de agua y hielo machacado y en cuyo matraz se habrán depositado unos trocitos de hielo, al igual que sobre el filtro de pliegues de papel, inmediatamente antes de proceder a la filtración de la disolución de la sal de diazonio. De este modo se evita cualquier eventual descomposición de dicha sal por aumento excesivo de la temperatura de la misma, durante la filtración indicada.

Terminada la filtración, se completa hasta el enrase el volumen del matraz aforado, mediante la adición de agua helada, cuidadosamente a través del mismo filtro de papel, que de este modo se lava al propio tiempo, evitándose pérdidas de substancia. En el filtro quedarán todavía algunos pequeños trozos de hielo, de los

depositados inicialmente, que también se lavarán, contribuyendo a mantener los mismos invariable la temperatura del agua de lavado añadida. Quedan así 25 c.c. de sal de diazonio, enrasados a cero grados y equivalentes a los 900 mgr. del ácido antranílico de partida (0'0065 moles).

El matraz aforado que contiene la disolución de la sal de diazonio, se guarda en la nevera eléctrica, en la que se conserva lista para ser utilizada con buenos resultados, durante un tiempo no superior a doce horas, ya que se altera muy lentamente.

*Obtención del éster.* — Se pesan exactamente 120 mgr. de fenilfosfato sódico (0'000528 moles) y sobre el mismo añaden 3 c.c. de agua, cuidadosamente medidos; con ello el fenilfosfato sódico se disuelve. Para preparar dicha disolución, se opera introduciendo el fenilfosfato sódico recién pesado, en un tubo de vidrio graduado con precisión y de paredes gruesas; de unos 15 c.c. de capacidad. El tubo se halla dispuesto al efecto en un vaso de precipitados, rodeado de un baño de una mezcla de agua y hielo machacado. Seguidamente se añaden los 3 c.c. de agua y se va agitando la mezcla de agua y fenilfosfato sódico con una varilla de vidrio, hasta completa disolución del mismo.

Se tienen dispuestas, separadamente, una disolución 0'5 N/ de hidróxido amónico y otra de ácido clorhídrico N/. Asimismo el librito de papel indicador universal de pH de la casa Merck.

Una vez todo ello a punto, se saca de la nevera el matraz aforado que contiene la disolución de la sal de diazonio; se aspiran 2'5 c.c. de la misma, mediante una pipeta graduada de precisión, y se vuelve a guardar el matraz aforado en la nevera. Estos 2'5 c.c. equivalen a 90 mgr. de ácido antranílico, o sea a 0'000650 moles; lo que representa trabajar con un ligero exceso de sal de diazonio sobre la cantidad teórica necesaria de fenilfosfato sódico, para asegurar la completa transformación de éste.

Aspirados con la pipeta dichos 2'5 c.c., se vierten seguidamente en el tubo graduado, que contiene la disolución indicada de fenilfosfato sódico mantenida a baja temperatura, efectuándolo no de golpe, sino de modo continuado, aunque rápidamente, y agitando mientras tanto la mezcla reaccionante constantemente con la varilla de vidrio.

Resultan de este modo 2'5 c.c. + 3 c.c. = 5'5 c.c. de mezcla reaccionante. Sobre la misma se vierten 2'6 c.c. de la disolución de hidróxido amónico 0'5 N/., previamente enfriada al efecto por prolongada permanencia en la nevera eléctrica. Dicha adición se efectúa lentamente y con continua agitación mediante la varilla de vidrio, quedando el pH de la mezcla reaccionante igual a 9 al papel indicador universal Merck; cuyo pH debe comprobarse hacia el fin de la adición de la disolución de hidróxido amónico, para in-

terrumpirla si es preciso, pues no conviene rebasarlo. En estas condiciones tiene efecto el proceso de copulación de la sal de diazonio con el fenilfosfato sódico, determinante de la formación del éster.

Como dicho éster no es muy estable a pH tan elevado, debe procederse rápidamente a disminuirlo; para ello se agregan 0'2 c.c. de HCl N/, con lo que queda a pH=6'5, aproximadamente. Se añaden, entonces, muy lentamente, unas gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0'5 N/ (alrededor de unos 0'05 c.c.) y pasa a pH=7. Esta técnica es la que permite efectuar lo expuesto con mayor seguridad y rapidez, ya que debe quedar la disolución del éster así obtenida a pH=7 aproximadamente, para no agotar después prematuramente las mezclas amortiguadoras, en las condiciones operatorias en que trabajamos con el indicador éster.

En las determinaciones de pH con papeles indicadores, especialmente los universales, debe tenerse muy en cuenta el carácter básico débil del hidróxido amónico, ya que no todos van bien al efecto, por inducir a error las coloraciones de los mismos.

Hemos ensayado varios papeles indicadores de pH, especialmente de los universales de diferentes marcas, para determinaciones de pH de mezclas tipo de disoluciones de hidróxido amónico y ácido clorhídrico, comprobando lo que queda expuesto. El error cometido llega a ser con frecuencia, incluso de una unidad inferior al valor real, sobre todo para valores de pH superiores a 7 en los papeles universales. Basta comparar al efecto tres o cuatro de diferentes marcas y se observarán tonalidades y hasta coloraciones distintas, correspondientes a una misma disolución clorhídrico-amoniaca. Lo más práctico es comprobar electrométricamente o con indicadores adecuados las coloraciones y tonalidades de cada papel para distintos valores de pH, comprendidos entre 6 y 9, y hacer las correcciones correspondientes en la escala de colores de cada marca de papel o de las colecciones de papeles de varios indicadores para valores determinados de pH. Operando de este modo, con papeles indicadores previamente confrontados y corregidos, bastará conocer el error cometido en cada caso, para poder emplear sin inconveniente alguno la marca de papel correspondiente, ya que ello es suficiente para nuestro objeto, resultando entonces muy práctico, rápido y ventajoso el empleo de papeles indicadores.

Si por error en la apreciación del pH se efectúa la copulación de la sal de diazonio con el fenilfosfato sódico, operando a pH superior, o bien muy inferior a 9; o incluso si la disolución final del éster obtenido queda a pH muy distinto de 7, el método de determinación de fosfatasas mediante dicho éster, no marcha en absoluto. Pequeñas variaciones de pH sobre los valores indicados, carecen, en cambio, de influencia en la marcha y precisión del método

y sólo determinan ligeras variaciones de la coloración inicial del éster, por hidrólisis parcial del mismo, que debido a las grandes diluciones en que operamos determinan muy ligeras variaciones en las lecturas fotométricas iniciales. Empleando, en cambio, siempre el mismo papel indicador, previamente contrastado, desaparecen por completo estas variaciones.

Es, por lo tanto, un detalle delicado a tener muy en cuenta, el de la determinación del pH sin gran error al efectuar la copulación de referencia, y después de realizada la misma, en las disoluciones del éster resultante.

El volumen total de dichas disoluciones del éster finalmente obtenido, oscilará alrededor de los 8'35 c.c. y se completa hasta el volumen de 10 c.c. con agua helada, agregada en el mismo tubo graduado, de 15 c.c. de capacidad, que se hallará constantemente introducido en el baño de agua y hielo machacado; pudiendo guardarse también en la nevera eléctrica durante tres o cuatro horas, sin gran descomposición hidrolítica del éster.

*Propiedades.* — Aparte las ya expuestas por uno de nosotros en publicaciones anteriores (1), debemos insistir aquí en el hecho de la tendencia a la fuerte disminución del pH de las disoluciones del éster, como consecuencia de su autohidrólisis, en ausencia de amortiguadores. De ello nos ocuparemos en otro lugar de este trabajo.

*Empleo del éster como substrato.* — Siguiendo una técnica similar a la descrita en líneas generales en trabajos anteriores (1), medimos exactamente 0'5 c.c. de la disolución del éster a pH=7, que la introducimos en un tubo fotométrico, lleno previamente hasta su mitad con la mezcla amortiguadora elegida, para completar seguidamente el volumen hasta el enrase del tubo mediante la adición de la cantidad necesaria de dicha mezcla, operando a la temperatura ambiente.

Utilizamos el mismo fotocolorímetro Evans de lectura directa, ya empleado por nosotros en otros trabajos. Disponemos al efecto de una colección de tubos para determinaciones en serie, que las efectuamos operando siempre a la temperatura ambiente. Dichos tubos son de una capacidad de 6'5 c.c. hasta el enrase.

Llenamos todos los tubos a emplear con la disolución del éster, operando en la forma expuesta y lo más simultáneamente posible. Agitamos seguidamente el contenido de cada tubo con una varilla de vidrio, substituída en alguno de ellos por un termómetro, para conocer constantemente la temperatura a la que se opera, ya que es la misma en todos los tubos.

A continuación y en los tubos previamente marcados al efecto, introducimos 0'1 c.c. del suero activo diluído o inactivado a estudiar, agitando la mezcla siempre con la misma varilla de vidrio

y procediendo sin demora a contar los intervalos de tiempo transcurridos desde la adición del suero y a efectuar seguidamente las lecturas fotométricas correspondientes.

#### PREPARACIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO

Empleamos suero muy fresco, inmediatamente de ser obtenido, ya que es detalle esencialmente fundamental, comprobado por nosotros sin lugar a dudas, que el tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre, la obtención del suero y la práctica de las determinaciones fosfatásicas, sea el mínimo posible. Ni aun guardado en la nevera se conserva y, además, el uso de agentes de conservación es completamente inútil y falsea los resultados analíticos, por actuar en todos los casos de verdaderos efectores enzimáticos, al menos en lo que respecta a las fosfatasas, operando con nuestros substratos cromógenos.

Para la obtención del suero, dejamos coagular la sangre durante unos veinte minutos y la sometemos seguidamente a centrifugación.

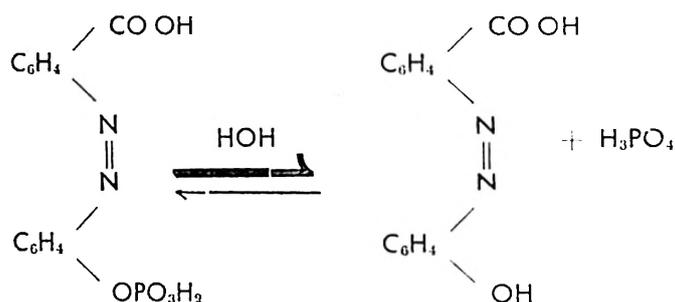
Medimos exactamente 1 c.c. de suero, que lo depositamos en un tubo que contiene 4 c.c. de agua destilada estéril, para agitar la mezcla con una varilla de vidrio, de modo que su aspecto sea completamente homogéneo. Los 4 c.c. de agua destilada se miden también exactamente, con lo que quedan así 5 c.c. de suero diluido, del cual separamos 0'1 c.c., cuidadosamente medidos, para la práctica de cada determinación fosfatásica, operando en la forma expuesta en párrafos precedentes.

Si se desea efectuar ensayos comparativos con suero inactivado, se dispone otro tubo idéntico, conteniendo los 5 c.c. del mismo suero diluido en idénticas condiciones. La inactivación la efectuamos por calefacción, pero debiendo proibirse la calefacción a ebullición, ya que, no obstante, operar con suero diluido, resulta siempre el líquido final algo opaco, como es sabido. Para evitarlo, calentamos los tubos al baño maría, de agua mantenida a 80-90°, durante media hora, pero asegurándose que la temperatura del contenido de cada tubo alcanza los 80° C., mediante el correspondiente termómetro. El líquido resultante deberá quedar completamente transparente, aunque un mínimo de turbidez casi imperceptible, no es obstáculo para la práctica de las determinaciones fotométricas ulteriores, conforme se deducirá del examen de las gráficas que ilustran este trabajo.

Sobre otros detalles operatorios y práctica de las determinaciones correspondientes, nada hemos de añadir a lo expuesto por Monche y Ferrer Arenillas, en trabajos anteriores (2).

### Discusión

La hidrólisis del éster 2,4'-carboxil-azobenceno-fosfórico, transcurre del modo siguiente (4):



En consecuencia ha de resultar considerablemente aumentada la acidez del medio, dado el carácter ácido fuerte del ácido monohidroxiazóico formado. Esto es precisamente lo que se observa en la práctica, puesto que las disoluciones del éster a  $\text{pH}=7$ , pasan por sí solas a  $\text{pH}=5-6$ , después de unos dos días de permanecer en la nevera. Ello nos obliga a trabajar en medios fuertemente amortiguados, siendo de verdadera importancia la mezcla amortiguadora elegida para el empleo como sustrato del éster 2,4'-carboxil-azobenceno-fosfórico, puesto que a la acidez propia del ácido fosfórico resultante hidrolíticamente, se suma la del ácido monohidroxiazóico de referencia.

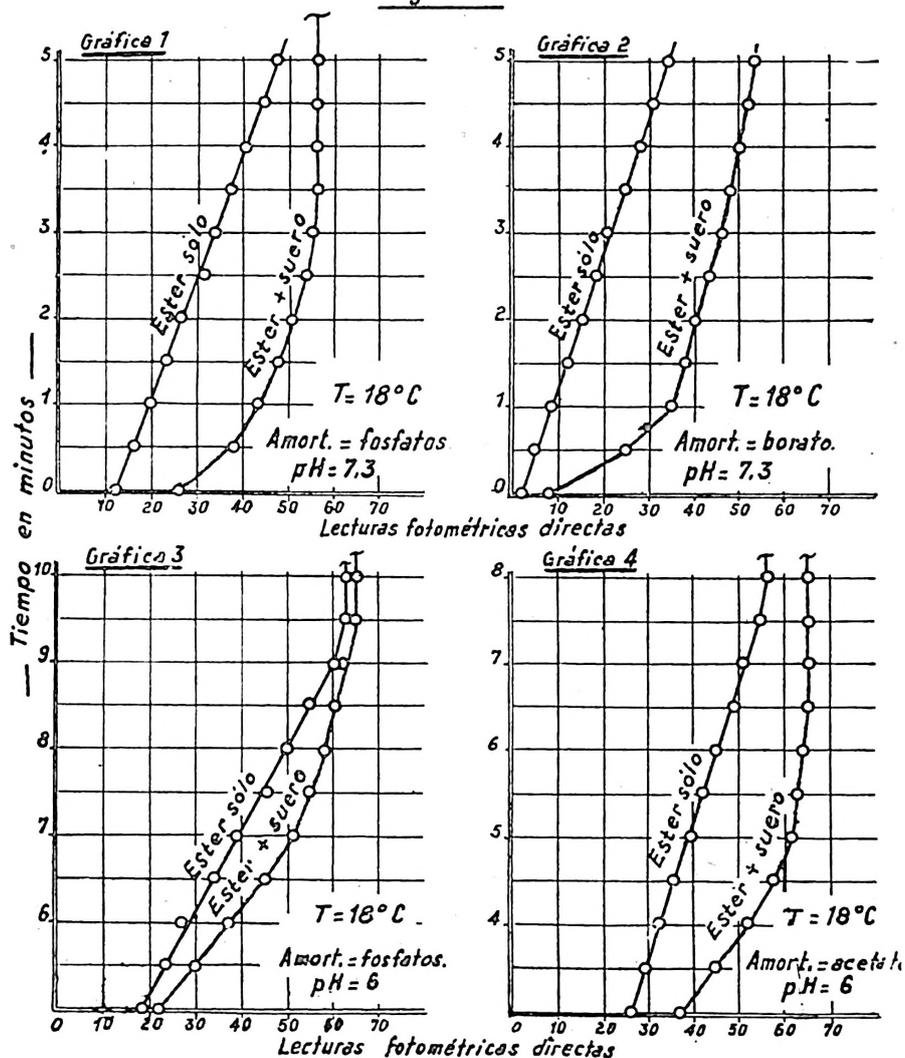
Las gráficas de la figura 1 ofrecen, en nuestro concepto, un ejemplo muy demostrativo en apoyo de lo que acabamos de exponer.

Las mezclas amortiguadoras que empleamos en dichas gráficas son la de fosfatos de Sørensen; la de acetato sódico y ácido acético de Michaelis y Krüger, ambas de  $\text{pH}$  independiente de la temperatura, y la de ácido bórico, cloruro potásico y sosa cáustica, de Clark y Lubs, cuyos  $\text{pH}$  son prácticamente independientes de las variaciones de la temperatura ambiente, a las que operamos (5).

Todas ellas las empleamos directamente, operando a la concentración 0'2 M/, que es la máxima necesaria. Esto nos obliga a comprobar cuidadosamente el  $\text{pH}$  de las mismas, mediante la colección de papeles indicadores Bayer, ya utilizada por nosotros en trabajos anteriores (1), que permite un margen de determinaciones de  $\text{pH}$  entre 0'1 y 14'0, con escala de colores.

Conforme puede observarse, hemos elegido las partes de las gráficas que corresponden a las máximas diferencias entre las velocidades hidrolíticas respectivas del éster, más el suero sanguíneo

Figura 1



y del éster solo, seleccionadas de entre las de una serie de ensayos similares que hemos efectuado, con resultados análogos. Evidentemente, cuanto mayor sea esa diferencia de velocidades, tanto mayor es la actividad fosfatásica y, por consiguiente, la sensibilidad del posible método de determinación analítica cuantitativa de fosfatasas, que tenemos actualmente en estudio. Aplicado el método con fines de ensayos comparativos, operando en identidad de condiciones experimentales, nos ha venido ofreciendo excelentes resul-

tados, dadas las diferencias de velocidad hidrolítica tan acentuadas, fácilmente observables de unos sueros a otros.

En los ensayos correspondientes a las cuatro gráficas de la figura 1, hemos empleado el mismo suero sanguíneo y puede observarse la influencia decisiva que la mezcla amortiguadora elegida ejerce sobre la marcha del proceso hidrolítico; hecho éste completamente lógico por la conocida influencia de la naturaleza y carácter de los electrólitos sobre los procesos hidrolíticos.

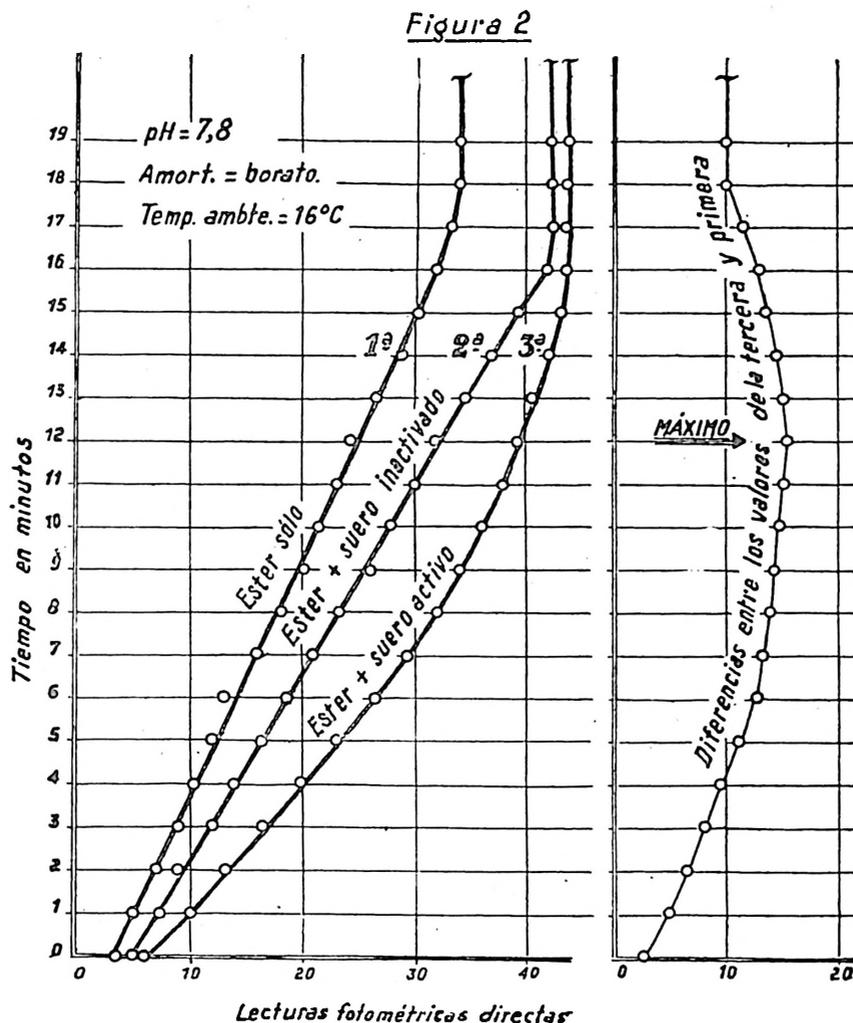
La mezcla amortiguadora de fosfatos de Sørensen (fosfatos disódico y monopotásico), es la que conduce a peores resultados. No así, en cambio, la de Clark y Lubs, de ácido bórico y borato y la de ácido acético y acetato, de Michaelis y Krüger, que son las óptimas, de entre las ensayadas por nosotros, ya que la de carbonato y bicarbonato sódico, de King, es a descartar, por desprender carbónico durante la marcha del proceso hidrolítico y cuyas burbujas determinan irregularidades en la transparencia de la mezcla hidrolítica reaccionante, que las acusa el fotocolorímetro, constituyendo un riesgo de error evidente.

Respecto al efecto del borato sobre el proceso fosfatásico, no hemos observado en ningún caso inhibición alguna, contrariamente a las afirmaciones de Ch. A. Zittle (6), según las que influye marcadamente sobre la actividad fosfodi- y monoesterásica, determinando una inhibición reversible de un 50 por ciento, a la concentración M/100. Pero evidentemente las condiciones operatorias empleadas por dicho autor, distan muchísimo de las utilizadas por nosotros en nuestros trabajos, con arreglo al plan que venimos desarrollando desde hace tiempo.

Comparando las gráficas 1 y 2 de la figura 1, la mayor diferencia entre las velocidades hidrolíticas correspondiente al operar en mezcla amortiguadora de ácido bórico y borato, es, sin embargo, muy similar a la observada operando con la mezcla amortiguadora de fosfatos, ambas a  $\text{pH}=7.3$ . En cambio, dichas diferencias son muy acentuadas en las gráficas 3 y 4, operando a  $\text{pH}=6$ . Resultados éstos que nos decidieron a elegir las mezclas amortiguadoras de ácido bórico y borato y de ácido acético y acetato para emplearlas en nuestros trabajos, sin perjuicio de otras que tenemos en estudio, para máximo poder amortiguador a  $\text{pH}=7.3-7.5$ .

Conforme hemos expuesto en la introducción de este trabajo, venimos considerando desde hace tiempo el interés que reviste la disponibilidad de métodos de determinación analítica cuantitativa de fosfatasas, no obstante expresarse los resultados analíticos, siempre en unidades arbitrarias de fosfatasa; pero caracterizados por operarse en condiciones que sean lo más similares posible a la de los medios internos biológicos del organismo en que actúan dichos enzimas.

Y dentro de esta orientación, la figura 2 ofrece, en nuestro concepto, un ejemplo muy demostrativo de las posibilidades del método, aplicado a la determinación cuantitativa de fosfatasa.



La comparación con suero inactivado, no ofrece ventaja alguna, conforme se observará (\*). La menor transparencia del mismo, acusada perfectamente en la gráfica, resta evidentemente sensibilidad al método, ya que se traduce en una disminución aparente

(\*) Tenemos al efecto en estudio la substitución del suero diluido por 0'1 c.c. de suero sin diluir, agregado directamente en el tubo fotométrico que contiene previamente el éster, en condiciones idénticas al éster patrón.

de las velocidades hidrolíticas respectivas por comparación entre las gráficas tercera y segunda; idéntica esta última a la primera enteramente, de no ser por la influencia del proceso de inactivación del suero en la transparencia del líquido resultante.

Conforme ya hizo notar Monche en un trabajo anterior (3), no rige la ley de Beer en las disoluciones de los colorantes monohidroxiarzoicos liberados hidrolíticamente de nuestros substratos cromógenos y que se traduce en dificultades, subsanables en nuestro concepto, para la puesta a punto del método con miras a su aplicación a la determinación cuantitativa de fosfatasas. Las condiciones experimentales elegidas para la práctica del método, responden al hecho expuesto, cuya influencia, como causa de error, tratamos de eliminar, al igual que en casos análogos, mediante la elección de técnicas adecuadas como las que son la base de nuestro método, todavía en estudio en algunos de sus aspectos, que serán objeto de atención especial en próximos trabajos, en curso de realización.

En la gráfica de la figura 2, correspondiente a las diferencias entre los valores de las gráficas tercera y primera, hemos señalado el máximo valor alcanzado por las diferencias indicadas. La media entre éste y los valores anterior y posterior inmediatos, nos dará el promedio de desviación máxima entre una y otra gráfica. Hemos intentado traducir este promedio en unidades de fosfatasa para comparación con el método de King, consiguiendo resultados muy satisfactorios. Las diferencias que se observan por comparación de las dos primeras gráficas de la figura 1 y las de la figura 2, aparte la distinta actividad del suero ensayado, corresponden a detalles de orden experimental todavía en estudio.

La fácil práctica y sencillez del método y el hecho de prestarse perfectamente a determinaciones en serie, que se efectúan con gran rapidez y en condiciones experimentales desprovistas totalmente de tratamientos físicos y químicos enérgicos, capaces de alterar profundamente la evolución normal del proceso de hidrólisis fosfatásica correspondiente, nos han inducido a dedicarle atención preferente, dada su utilidad práctica como método de comparación de velocidades hidrolíticas y sus posibilidades de aplicación a la determinación cuantitativa de fosfatasas.

### Resumen

Siguiendo el plan establecido por uno de los autores en trabajos anteriores, se ha revisado y estudiado especialmente con fines de análisis cuantitativo, las propiedades y aplicación del éster 2,4'-carboxil-azobenceno-fosfórico como substrato para fosfomonoesterasas. Se estudia igualmente, fundándose en las propiedades de dicho éster como substrato, las posibi-

lidades de aplicación del mismo con miras al establecimiento de un método rápido y práctico, de interés clínico, para la determinación de estas enzimas, trabajando en condiciones muy suaves, en un primer intento de aproximación a la suavidad con que ocurren estos procesos fosfatásicos en los medios biológicos internos del organismo.

### Summary

Following the assumptions established by Monche in previous papers, the synthesis, properties and application of the 2,4'-carbozyl-azobenzene-phosphoric ester as substrate for phosphomonoesterases, have been revised by the authors and specially studied for quantitative analytical purposes as the basis of a possible rapid and practical clinical method for the evaluation of these enzymes in the most very smooth physical and chemical experimental conditions in connection of the smoothness of the internal biological systems of the organism in which the phosphatasic hydrolysis is developed.

### Bibliografía

- (1) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **6**, 239-253 (1951) ; **7**, 229-235 (1951). *Anales Real Sdad. Españ. Fís. y Quím.*, **B-48** 499-522 (1952). *Bull. Sté. Chim. Biol.*, pendiente de publicación.
- (2) MONCHE, J. y FERRER ARENILLAS, M., *R. esp. Fisiol.*, **8**, 131-147 y 225-237 (1952).
- (3) MONCHE, J. : *Anales Real Sdad. Españ. Fís. y Quím.*, **B-48** 507-509, 514-515 y 522 (1952).
- (4) MONCHE, J. : *Bull. Sté. Chimie Biologique*, pendiente de publicación.
- (5) SÖRENSEN, S. P. L. y JÖRGENSEN : «Théorie, mesure et applications du pH», **191**, 195 y 196 (Dunod, París, 1938).
- (6) ZITTLE, CH. A. : *J. Biol. Chem.*, **167**, 297-298 (1947).

