

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

Procesos fosfomonoesterásicos I y II, "in vitro", a pH = 7

J. Monche

(Recibido para publicar el 21 de noviembre de 1956)

Desde hace tiempo venimos estudiando las relaciones existentes entre la constitución química y la velocidad de hidrólisis de substratos cromógenos para fosfatasas (2) con el fin de disponer de nuevos ésteres ortofosfóricos que por su fácil hidrólisis permitieran su empleo como substrato en condiciones lo más próximas posibles a las de los medios internos biológicos en que actúan las fosfomonoesterasas I y II (fosfatasas alcalina y ácida, respectivamente), tan difundidas, como es sabido, en el organismo.

Y dentro de esta orientación fijamos nuestra atención en la síntesis de nuevos monoésteres ortofosfóricos, muy ácido y alcalinolábiles, por su constitución química especial, y capaces, por lo mismo, de aplicación a la práctica de medidas directas de actividad fosfatásica, operando en la zona de valores de pH comprendidos alrededor de 7.

Entre los nuevos monoésteres ortofosfóricos obtenidos por nosotros se mostró muy indicado para el estudio de los procesos fosfomonoesterásicos, en las condiciones que acabamos de exponer, el éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico. De su técnica de obtención y empleo como substrato dimos un avance, en líneas generales, en un trabajo anterior (3), que tuvo por objeto el estudio de su hidrólisis fosfomonoesterásica I y II, en función del pH del medio.

Como continuación de dicho trabajo y partiendo de los hechos expuestos en el mismo, nos ocupamos más ampliamente

en el presente del comportamiento del éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico como sustrato para el estudio de los procesos fosfomonoesterásicos I y II, «in vitro», a pH=7, y damos los detalles necesarios para su aplicación «in vivo», especialmente administrado a animales de experimentación.

Material y métodos

ESTER 2,4'-CARBOXILAZOBENCENO FOSFÓRICO

Se obtiene por copulación de la sal de diazonio del ácido antranílico (orto-aminobenzoico) con el fenilfosfato disódico (4).

Partimos de una disolución acuosa de dicha sal de diazonio, obtenida diazoando 900 mg. de ácido antranílico purísimo (0'0065 moles). La disolución resultante se filtra a baja temperatura (0-5° C.), para eliminar cualquier posible vestigio de impurezas, y el filtrado se recoge en un matraz aforado de 25 c. c., mantenido asimismo a baja temperatura. La copulación se efectúa añadiendo 1'25 c. c. (*) de esta disolución a una disolución de 120 mg. de fenilfosfato disódico (0'00055 moles) en 3 c. c. de agua. El volumen final de la disolución del éster así resultante se completa con agua helada hasta 10 c. c. en un matraz aforado (**). Todos los detalles operatorios constan en una publicación anterior (5).

EMPLEO DEL ÉSTER COMO SUBSTRATO «IN VITRO»

Una serie de tubos fotométricos (empleamos los del fotocolorímetro EVANS, de lectura directa) se llenan hasta la mitad de su enrase con la mezcla amortiguadora de CLARKS y LUBS, para la fosfatasa alcalina, o con la de MICHAELIS y KRÜGER, para la fosfatasa ácida; ambas mezclas amortiguadoras obtenidas a concentraciones 0'2 molares. Todos los tubos de la serie se mantienen a la temperatura de 15-16° C. (***) y se introduce en cada uno, de 0'1 a 1 c. c. de una dispersión acuosa 1/5, del líquido biológico o preparado fosfomonoesterásico en estu-

(*) Por error apareció en una publicación anterior 2'5 c. c. (5).

(**) La copulación, efectuada en las sencillas condiciones expuestas, es una operación delicada, por la escasa actividad reaccionante de esta sal de diazonio con el fenilfosfato disódico, que ha de ser purísimo, previamente lavado con éter anhidro. Mucho mejor resultado se obtiene operando a gran concentración, conforme se indica más adelante en este trabajo. El ácido antranílico de partida debe ser también purísimo y dar, por diazoación, disoluciones diluidas incoloras. En caso contrario, y antes de filtrarlas para diluir después, pueden purificarse por agitación a baja temperatura (0° a 5° C.), durante diez minutos, con 10 mg. de carbón activo («Ultra-carbón Merck»). Las disoluciones cuya coloración persista, a pesar del tratamiento con carbón activo, así como las de franca turbidez, son inservibles. Estas comprobaciones deben efectuarse siempre, además de la determinación del punto de fusión.

(***) Si la temperatura del laboratorio es superior a 16° C., se mantendrá el contenido de los tubos a 15° C., introduciéndolos en un baño de agua.

dic (*) activo, o bien previamente inactivado por calefacción, en la forma descrita por nosotros (6), y se completa seguidamente hasta el enrase (6'5 c. c.) el contenido de los mismos, con la mezcla amortiguadora correspondiente. Se agitan los tubos y se comprueba la temperatura de los líquidos así resultantes. Las disoluciones de las mezclas amortiguadoras empleadas al efecto se habrán mantenido previamente a la temperatura de 15° C.

Una vez todo ello realizado, se introduce en cada tubo, en el menor intervalo posible de tiempo, de tubo a tubo, 0'5 c. c. de la disolución del éster a pH=7'0; se agita el contenido y se empiezan a contar inmediatamente los tiempos correspondientes al desarrollo de color por tubo, en cada lectura fotocolorimétrica. Los tiempos iniciales por tubo serán, evidentemente, los transcurridos desde la agitación inmediata del contenido del tubo, recién añadido el éster, hasta la primera lectura fotocolorimétrica. Para intervalos de tiempo muy pequeños (tiempo en segundos) se opera en la forma descrita por nosotros en un trabajo anterior (14).

OBTENCIÓN DEL ÉSTER PARA SU ADMINISTRACIÓN A ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Dada la imposibilidad de aislamiento del éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico de sus disoluciones acuosas, por impedirlo su gran inestabilidad durante los tratamientos correspondientes, hemos recurrido al efecto a la práctica de la síntesis del mismo, operando constantemente en la mayor ausencia de agua y en condiciones de obtenerlo libre de toda clase de sustancias tóxicas para el organismo animal.

a) *Preparación de la sal de diazonio en disolución alcohólica.*

900 mg de ácido antranílico purísimo (0'0065 moles) se diazoan en medio hidroalcohólico, según el clásico método de GRIESS (1).

Disolvemos en 10 c. c. de alcohol absoluto el clorhidrato del ácido antranílico, obtenido añadiendo 2'6 c. c. de ácido clorhídrico 5 N a los 900 mg. de ácido antranílico. El clorhidrato se disuelve perfectamente en el alcohol y la disolución resultante se introduce en un tubo de unos 30 c. c. de capacidad, dispuesto en forma de frasco lavador de gases, mantenido a baja temperatura mediante un baño de agua y hielo machacado.

(*) Tratándose de suero sanguíneo humano, se empleará por tubo 1 c. c. de suero diluido 1/5, activo o inactivado. Por error se hizo constar 0'1 c. c. en una publicación anterior (6).

Todo el tubo y dispositivo es de vidrio, con ajuste esmerilado.

Separadamente se dispone otro tubo similar, con 10 c. c. de ácido nítrico concentrado ($d=1.33$) y 9 g. de anhídrido arsenioso. Este tubo se diferencia del anterior en que su tapón, de vidrio esmerilado, sólo lleva soldado un tubo de desprendimiento, en comunicación, mediante un manguito de empalme (trozo de tubo de goma), con un tubo idéntico al primero, pero vacío e introducido en un baño de agua fría (temperatura del baño: 0 a 5°C.). Este tubo se conecta a su vez con la boca del tubo de rama larga, del tubo que contiene la disolución alcohólica clorhídrica, del clorhidrato del ácido antranílico a diazoar.

El aparato consta, por lo tanto, de tres tubos; dos de ellos, el primero y el último, reactores. El segundo, en cambio, es para refrigeración del N_2O_3 , desprendido y eliminación de partículas arrastradas con dicho gas.

Una vez todo el aparato así dispuesto, se calienta suavemente a fuego directo el tubo que contiene la mezcla de ácido nítrico concentrado y de anhídrido arsenioso, de modo que el desprendimiento gaseoso, regulado por las burbujas que se observan en la disolución del clorhidrato del ácido antranílico a diazoar, sea muy lento.

El paso de N_2O_3 por el contenido del tubo de diazoación se da por terminado en cuanto una tira de papel de filtro, impregnada de la disolución de yoduro potásico empleada por nosotros (7), acusa dicho gas en el tubo de salida del tubo de diazoación. Llegado este momento, se elimina prácticamente el exceso de N_2O_3 por arrastre mediante una corriente de nitrógeno frío burbujeando a través de la disolución alcohólica de la sal de diazonio. Para ello, el nitrógeno de entrada en el tubo de diazoación se hace pasar previamente por un pequeño frasco lavador de gases con ácido sulfúrico concentrado, enlazado a un serpentín introducido en una mezcla de agua y hielo machacado. Basta el transcurso de un minuto de paso de nitrógeno seco y frío a través de la disolución alcohólica de la sal de diazonio para eliminar prácticamente el exceso de N_2O_3 .

La disolución alcohólica de la sal de diazonio del ácido antranílico que así resulta, se introduce directamente en un matraz aforado de 25 c. c. de capacidad y se completa su volumen hasta el enrase del matraz, con alcohol absoluto. Se obtiene de este modo una disolución alcohólica de dicha sal de diazonio, de igual concentración que la resultante al operar en disolución acuosa, según la técnica descrita precedentemente en este trabajo.

b) *Obtención del ester en estado sólido amorfo.*

Se disuelven 120 mg. de fenilfosfato disódico (0.00055 moles)

en 1 c. c. de agua destilada y se añaden seguidamente 2 c. c. de alcohol absoluto. La disolución resultante se vierte en un tubo idéntico, bajo todos conceptos, al de diazoación e igualmente dispuesto. Se introducen seguidamente 2'5 c. c. de la disolución alcohólica de la sal de diazonio (2'5 c. c. = 0'00065 moles del ácido antranílico de partida).

Separadamente se prepara una disolución alcohólica de amoníaco, saturando a la temperatura ambiente 15-20 c. c. de alcohol absoluto con una corriente de gas amoníaco seco, obtenida calentando una disolución acuosa concentrada de hidróxido amónico y desecando el gas; haciéndolo pasar a través de un tubo de vidrio lleno de trozos de cal viva.

Se prepara, asimismo separadamente, una disolución hidroalcohólica de HCl, mezclando 1 c. c. de HCl N/1 con 3 c. c. de alcohol absoluto.

Se tienen, por último, dispuestas unas tiras de papel de filtro impregnadas de disoluciones de azul de timol y de ácido rosólico (zonas de viraje: pH = 8'0 a 9'6 y 6'9 a 8, respectivamente). Las tiras de papel se utilizan húmedas.

Tanto el tubo que contiene la mezcla de la sal de diazonio y del fenilfosfato sódico, como los de las disoluciones alcohólicas de amoníaco y de ácido clorhídrico, se mantendrán en un baño de agua y hielo machacado.

Una vez todo dispuesto se añade, lenta y progresivamente, mediante una micropipeta, la disolución alcohólica de amoníaco sobre la mezcla de la sal de diazonio y del fenilfosfato sódico, agitando la mezcla con una pequeña varilla de vidrio, hasta que, efectuado un toque con dicha varilla sobre el papel impregnado de la disolución de azul de timol, se acuse el viraje del amarillo al azul. Debe operarse con mucho cuidado para no añadir más que la cantidad estrictamente precisa de la disolución alcohólica amoniacal para el viraje del indicador. Se dejan transcurrir entonces unos diez minutos, agitando de cuando en cuando la mezcla reaccionante con la varilla, y se añade seguidamente en la misma forma la disolución hidroalcohólica de ácido clorhídrico, hasta el momento en que, efectuado un toque sobre el papel impregnado de la disolución de ácido rosólico, se inicie el viraje franco del indicador del color rojo al amarillo (pH no menor de 6'9).

Seguidamente se adapta al tubo que contiene la disolución del ester resultante al operar en la forma expuesta, el tapón de vidrio esmerilado que lleva soldados los dos tubos del dispositivo lavador de gases y se le conecta con la trompa de agua por el tubo de rama corta. El tubo de rama larga se hallará en comunicación con un serpentín introducido en un baño de mezcla

de agua y hielo machacado y el serpentín, a su vez, con un frasco lavador de gases con ácido sulfúrico concentrado, de modo que se pueda hacer pasar una corriente de nitrógeno seco y frío a través de la disolución alcohólica del éster (*).

En el manguito de goma, de empalme del serpentín con la entrada de nitrógeno en el tubo que contiene la disolución del éster, se adapta una pinza de paso regulable, graduándola de tal modo que al poner en marcha la trompa de agua, se opere en el interior del tubo a presión reducida. De este modo se concentra el contenido del tubo prácticamente hasta sequedad, a la temperatura de 0°C. (baño de agua y hielo machacado). En esta operación se invierte unos 20 minutos.

El residuo sólido amorfo, de aspecto pastoso y color amarillo, consistente en el éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, que así se obtiene, se disuelve en 2 c. c. de suero fisiológico, como mínimo, para experiencias «in vivo» a gran concentración. De esta disolución al 10 % del éster en suero fisiológico, se pueden separar las partes que se deseen para diluirlas a la concentración conveniente, según los casos. Puede también emplearse para ensayos «in vitro» (0'1 c. c. = 0'5 c. c. de la disolución del éster preparada sintetizándolo en disolución acuosa).

c) *Ensayos comparativos de toxicidad.*

Conforme lo hemos expuesto en un trabajo anterior (7), el éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico es bien tolerado por los animales de experimentación, incluso a altas dosis y por vía endovenosa.

Hemos ensayado comparativamente la toxicidad de la disolución del éster a pH=7'3, sintetizado en disolución acuosa para ensayos «in vitro», y la correspondiente a la disolución del éster en suero fisiológico, sintetizado operando en disolución alcohólica, para ensayos «in vivo».

Hemos dispuesto tres lotes de seis ratas blancas, cada una de 250 g. de peso. Al primer lote de ratas inyectamos por vía intramuscular 1 c. c. de la disolución del éster tal como resulta para su empleo como substrato «in vitro» y al segundo y tercer lote de ratas les inyectamos, por vías intramuscular y endovenosa, respectivamente, 1 c. c. de la disolución del éster en suero fisiológico para ensayos «in vivo». Las ratas del primer lote mueren todas al cabo de las cuatro o cinco horas de practicada la inyección. En cambio, todas las del segundo y tercer lote,

(*) Nitrógeno almacenado desalojando el agua de una probeta invertida, provista de llave de paso en su parte superior, según técnica corriente.

viven perfectamente, sin acusar prácticamente síntomas manifiestos de intoxicación.

Como la disolución del ester en suero fisiológico es al 10 %, según hemos ya expuesto, la dosis del ester inyectada por kilo de peso de animal es de 2 g.

Respecto a la gran toxicidad de la disolución del ester tal como resulta para su empleo como sustrato «in vitro», nos ocuparemos en la discusión de este trabajo.

d) *Estudio de la hidrólisis fosfatásica del ester 2,4-carboxilazobenceno fosfórico.*

Este estudio ha sido efectuado en las condiciones experimentales descritas al principio del presente trabajo para el empleo del ester como sustrato «in vitro». Los resultados se exponen en las figuras 1 y 2. Las gráficas correspondientes han sido obtenidas operando con preparados purificados de las fosfomonoesterasas I y II (8).

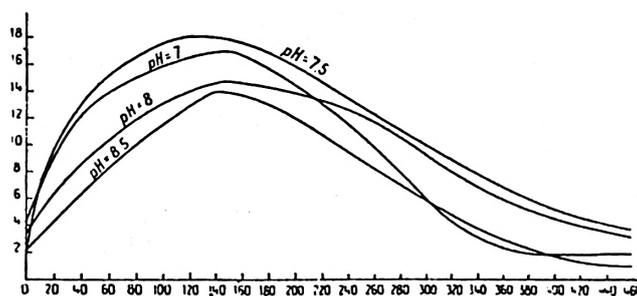


Fig. 1. — Fosfatasa alcalina. T = 15.5° C. Curvas de las diferencias entre las densidades ópticas correspondiente al sustrato + fosfatasa y al sustrato solo, en función del tiempo.

En ordenadas: las densidades ópticas.
En abscisas el tiempo en segundos.

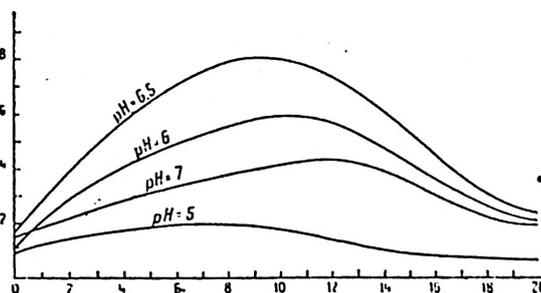


Fig. 2. — Fosfatasa ácida. T = 16° C. Curvas de las diferencias entre las densidades ópticas correspondiente al sustrato + fosfatasa y al sustrato solo, en función del tiempo.

En ordenadas: las densidades ópticas.
En abscisas: el tiempo en minutos.

Discusión

El examen de la figura 1 permite apreciar que con la fosfatasa alcalina, la velocidad de hidrólisis es poco sensible a la disminución del pH en la zona estudiada. Con la fosfatasa ácida (fig. 2) las diferencias son mucho más notables y el pH óptimo se sitúa hacia 6'5. Operando a $\text{pH}=7$, ambas, la fosfatasa ácida y sobre todo la alcalina, son particularmente activas sobre el ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico.

La forma de campana de estas curvas obedece al hecho de que por razón de la hidrólisis no enzimática del substrato, la totalidad de este último es finalmente desdoblada, tanto en presencia como en ausencia del enzima. Es, pues, al principio de la reacción, en la fase ascendente de las curvas, que se puede apreciar la actividad fosfatásica. Los detalles experimentales, no expuestos en el presente trabajo, constan en otro anterior (3) (*).

A las concentraciones propias en esta clase de trabajos, la presencia de preparados purificados de fosfatasa, previamente inactivados, carece de influencia alguna en las densidades ópticas correspondientes a la hidrólisis química del ester. Operando, en cambio, con dispersiones inactivadas de autolizados o de suero sanguíneo diluído, la menor transparencia de las mismas, aun siendo pequeña, disminuye la sensibilidad del método, y ello se traduce en una disminución aparente de la velocidad de hidrólisis fosfatásica, referida a la de mezclas del ester con preparados impuros de fosfatasa inactivada, conforme se observa perfectamente en el caso del suero sanguíneo (9).

La temperatura ambiente del laboratorio puede influir en la transparencia real de los tubos fotométricos, cuando es muy superior a la de 15-16° C. de incubación, debido a efectos de ligera condensación de la humedad atmosférica en la superficie externa de los tubos fotométricos, al someter el contenido de los mismos a examen fotocolorimétrico. Este inconveniente lo hemos subsanado perfectamente, deteniendo los procesos hidrolíticos correspondientes, mediante la adición de una disolución molar de fosfato monosódico, que por inhibir los procesos fosfomonoesterásicos, ácidos y alcalinos, permite efectuar las lecturas fotocolorimétricas a temperatura ambiente superior a la de incubación, y de ello hemos de ocuparnos en una próxima pu-incubación (**).

(*) Por error tipográfico aparecieron cambiadas las leyendas impresas al pie de las cuatro figuras que ilustran dicho trabajo (3), referentes a las densidades ópticas y al tiempo; haciéndose constar como abscisas a las primeras y como ordenadas al segundo, en lugar de designar en ordenadas a las primeras y en abscisas al segundo.

(**) Añadimos 1 c. c. de esta disolución molar por tubo.

Los ensayos comparativos de toxicidades respectivas de la disolución del ester para ensayos «in vitro», y en suero fisiológico para ensayos «in vivo», ofrece, en nuestro concepto, interés especial por el contraste entre la perfecta tolerancia de esta última y la gran toxicidad de aquélla. Esta gran toxicidad obedece fundamentalmente a la presencia de fenilfosfato disódico inalterado en dichas disoluciones del ester. Conforme hemos expuesto en páginas anteriores, preparamos el ester para su empleo «in vitro», partiendo de 120 mg. de fenilfosfato disódico (0'00055 moles) y de 1'25 c. c. de la disolución de la sal de diazonio (0'000325 moles del ácido antranílico de partida); queda, pues, un exceso de fenilfosfato disódico, de unos 0'000225 moles, sobre la cantidad teórica necesaria; pero, aun en el caso de que partiéramos de 2'5 c. c. (0'00065 moles del ácido antranílico inicial), de la disolución de la sal de diazonio, tampoco se copula cuantitativamente el fenilfosfato disódico con dicha sal, al operar a gran dilución, dada la considerable influencia que ejerce siempre en esta clase de procesos, como es sabido, la concentración de las sustancias reaccionantes, mayormente en el caso presente, puesto que la sal de diazonio derivada del ácido antranílico (*orto*-aminobenzoico), se halla sujeta al impedimento estérico de los derivados *orto* (10).

Partiendo de 2'5 c. c. de la disolución de la sal de diazonio, existe siempre un exceso de sal de diazonio inalterada y, por lo tanto, de fenilfosfato disódico, en la disolución del ester finalmente resultante. Este exceso de sal de diazonio no influye prácticamente en las densidades ópticas correspondientes al sistema hidrolítico, cuando se trabaja con preparados puros de fosfatasa alcalina del intestino de perro o ácida del salvado de trigo (8). Trabajando, en cambio, con autolizados de intestino o con suero sanguíneo, el exceso de la sal de diazonio inalterada, da reacciones coloreadas intensas con la mezcla de proteínas diversas y demás grupos amino terminales libres presentes (11), que enmascaran los valores reales de las densidades ópticas correspondientes al proceso hidrolítico, disminuyendo la sensibilidad del método, especialmente operando en medio alcalino, favorable en general a todos los procesos de copulación.

Estas diazorreacciones constituyen, por lo tanto, un método muy sensible para la determinación fotocolorimétrica de la sal de diazonio libre. Nos ha permitido fijar las condiciones óptimas de realización práctica del proceso de copulación de la sal de diazonio del ácido antranílico con el fenilfosfato disódico y llegar a la conclusión de que empleando 1'25 c. c. de la sal de diazonio del ácido antranílico purísimo, para los 120 mg. de fenilfosfato disódico, queda sobradamente asegurada la copu-

lación cuantitativa de la sal de diazonio. El exceso de fenilfosfato inalterado, en la disolución del ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, no ejerce influencia alguna en la marcha de los procesos hidrolíticos y del desarrollo de color correspondiente. Debe, pues, operarse siempre con un exceso de fenilfosfato, cuya presencia inalterado en las disoluciones del ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico es prácticamente difícil de evitar, al sintetizarlo trabajando en disolución acuosa, conforme se comprenderá por cuanto acabamos de exponer.

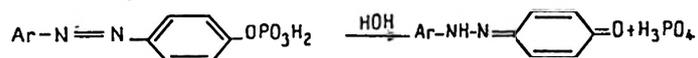
Pero si para la aplicación del ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico en ensayos «in vitro», no ofrece inconveniente alguno la presencia de fenilfosfato disódico inalterado en las disoluciones correspondientes, lo ofrece, en cambio, con miras a la práctica de ensayos «in vivo» en todos los casos en que los animales deban sobrevivir y según los ensayos. Bastan cantidades mínimas de fenol, del orden del miligramo por kilo de peso del animal, tratándose de ratas blancas, para que acusen rápidamente los síntomas de la conocida intoxicación, al administrarlo por vía intramuscular, mientras que la acción del fenilfosfato disódico es muchísimo más lenta (unos treinta minutos); hecho éste que demuestra la lentitud manifiesta de la hidrólisis del fenilfosfato disódico por el organismo animal (12) y cuya toxicidad corresponde a la del fenol liberado.

En cambio, el ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, sintetizado operando en medio alcohólico, en la forma expuesta en este trabajo, es perfectamente tolerado por los animales de experimentación, incluso por vía endovenosa y a la dosis de 2 g. por kilo de peso de animal, en ratas blancas. Este hecho demuestra que, al efectuar el proceso final de separación del ester y debido al aumento progresivo de la concentración de la sal de diazonio y del fenilfosfato por eliminación continua del disolvente a presión reducida, se copulan los dos cuantitativamente a pH no inferior a 6'9 al que operamos; compensándose con el aumento progresivo de la concentración de ambos en el sistema, el efecto de la poca actividad reaccionante de la sal de diazonio del ácido antranílico, debido al impedimento estérico, como derivado *orto* que es dicho ácido; impedimento favorecido especialmente a pH de copulación tan bajo.

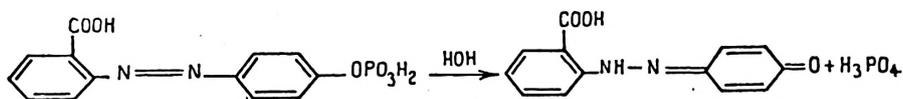
Esta perfecta tolerancia del ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico por los animales de experimentación, demuestra que obtenido en la forma expuesta, se halla libre de fenilfosfato disódico o de sal de diazonio inalterados, puesto que la presencia de cualquiera de los dos en cantidades prácticamente apreciables, la acusarían en seguida los animales de experimentación, con los síntomas de intoxicación correspondientes. Ofrece, ade-

más, una prueba de que también el ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico participa de la propiedad común a todos los esteres arilazofenil fosfóricos obtenidos por nosotros, de su perfecta tolerancia por los animales de experimentación (12).

Atendiendo a las condiciones de síntesis del ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, tanto si se opera en medio acuoso, como en disolución alcohólica, y a los hechos que hemos observado en uno y otro caso. Teniendo en cuenta, por otra parte, las dificultades halladas en la fosforilación de los colorantes monohidroxiazóicos por el oxiclóruo de fósforo (13), así como la mayor estabilidad de todos estos esteres en medio ácido que en medio alcalino, nos hemos visto inducidos a interpretar el proceso de hidrólisis y de irreversibilidad de los esteres arilazofenil fosfóricos, según el esquema siguiente :



y para el ester 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico, la hidrólisis debe ocurrir según la reacción :



Dado el carácter ácido fuerte del ácido quinónico formado, cabía esperar un aumento de la acidez del medio. Es precisamente lo que hemos observado: las disoluciones conservadas en la nevera, pasan en dos días de pH=7'0, a un pH comprendido entre 5'0 y 6'0, lo que obliga a trabajar en un medio fuertemente amortiguador del pH.

Debemos expresar nuestro agradecimiento al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Gobierno francés por las pensiones que nos concedieron para realizar estudios sobre los procesos fosfomonoesterásicos en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Farmacia de París y nos complacemos en reiterar nuestro reconocimiento a los profesores P. FLEURY, J. E. COURTOIS y A. DESJOBERT por su valioso apoyo, así como al doctor M. R. PERLÈS por su ayuda en la redacción de un trabajo anterior (3), que nos ha sido muy útil en el presente.

Resumen

Como continuación del estudio iniciado en un trabajo previo (3) sobre el éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico como substrato cromógeno para fosfomonoesterasas, se dan en el presente nuevos datos sobre la síntesis y propiedades químicas y biológicas de este substrato, especialmente para la realización de experiencias «in vivo». La gran ácido- y alcalinolabilidad de dicho éster, le hace apropiado para su empleo como substrato en condiciones de gran suavidad, comparables desde este aspecto a las de los medios biológicos. Las propiedades hidrolíticas correspondientes permiten la acción de las fosfatasas ácida y alcalina al mismo pH = 7. La interpretación de estos procesos es discutida por el autor.

Summary

Following the study initiated in a previous paper (3), about the 2,4'-carboxylazobenzene phosphoric ester as chromogenic substrate for phosphomonoesterases, new data concerning the synthesis and chemical and biological properties of this substrate are given by the author, specially to be employed in experiments «in vivo». The great acid- and alkalinelability of the 2,4'-carboxylazobenzene phosphoric ester, makes it appropriated to be used as substrate in very smooth experimental conditions in agreement with the smoothness of biological processes. The hydrolytical properties of this substrate are suitable for the action of the alkaline and acid phosphatases at the same pH = 7. The interpretation of this processes is discussed.

Bibliografía

- (1) GRIESS, P. (GISLON, A.) : *Traité Chim. Org.* (Grignard) ; **15**, 108. Masson, París, 1948.
- (2) MONCHE, J. : Abstracts of communications of XVIII International Physiol. Congress, 365 y 366 (Copenhagen 1950) ; *R. esp. Fsiol.* ; **6**, 239-253, 1951. *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48**, 499-522, 1952. *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 317-323, 1955.
- (3) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 317-323, 1955.
- (4) MONCHE, J. : *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48**, 514 y 515, 1955. *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 317-323, 1955.
- (5) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 318 y 319, 1955.
- (6) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 319, 1955.
- (7) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 318, 1955.
- (8) MONCHE, J. : *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48** 507 y 509, 1952. *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 320, 321 y 322, 1955.
- (9) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 319 y 320, 1955.
- (10) MONCHE, J. : *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48**, 519, 520 y 521, 1952. *Bull. Soc. Chim. biol.* ; **37**, 322 y 323, 1955.
- (11) MONCHE, J. : *Actas Sdad. Esp. Cienc. Fisiol.* ; 127 y 128, 1953. *Annales Biologie Clin.* ; **12**, 553-560, 1954.
- (12) MONCHE, J. : *R. esp. Fsiol.* ; **10**, 33, 1954.
- (13) MONCHE, J. : *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48**, 512, 1952.
- (14) MONCHE, J. : *Anal. R. Sdad. Esp. Fts. Quím.* ; B **48**, 510 y 511, 1952.