

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

Substratos cromógenos de hidrólisis rápida para fosfatasas y sus aplicaciones analíticas

M. Ferrer Arenillas

(Recibido para publicar el 3 de diciembre de 1955)

Continuando nuestros estudios realizados en colaboración con MONCHE, en un trabajo anterior (3), hemos considerado interesante dedicar atención especial a algunos aspectos que plantea la aplicación de los substratos cromógenos azoicos a la determinación cuantitativa de fosfatasas.

KAPLAN y NARAHARA (1) efectúan la determinación cuantitativa del fenol liberado enzimáticamente mediante la introducción en el sistema de una sal de diazonio estable a la temperatura de incubación de 37°, a la que operan. Su método difiere fundamentalmente del empleado por nosotros (5) en que no utilizan un substrato cromógeno, puesto que la sal de diazonio la emplean como reactivo del fenol liberado y no, en cambio, para la síntesis del éster fosfórico elegido como substrato. Lo aplican a la determinación de la fosfatasa sérica alcalina y ácida mediante el fenilfosfato sódico como substrato.

Por nuestra parte, hemos ensayado ampliamente el método de KAPLAN y NARAHARA. Ofrece el inconveniente de no tenerse en cuenta el hecho demostrado por MONCHE (4) de la capacidad de copulación de las sales de diazonio, operando en presencia de fenol, de fenilfosfato sódico inalterado y de las proteínas séricas, con estos tres componentes del sistema, directamente y en proporciones dependientes de su concentración respectiva, especialmente operando en medio fuertemente alcalino, según lo efectúan dichos autores. En las condiciones operatorias por ellos descritas no todas las disoluciones que se comparan foto-

colorimétricamente contienen conjuntamente dichos tres componentes y las coloraciones así resultantes, siempre demasiado íntensas, difieren, por lo tanto, según que se obtengan en presencia o ausencia de fenilfosfato sódico o en presencia de las cantidades variables de éste, que resulta inalterado en la hidrólisis química a 37° C, en un tiempo dado, difícil de fijarlas con precisión, experimentalmente, en determinaciones microquímicas. Por lo tanto, las tonalidades del color resultante en las disoluciones que se comparan están sujetas a variaciones que determinan que los valores de las densidades ópticas correspondientes no sean estrictamente comparables para un mismo filtro del fotocolorímetro. Hechos éstos fáciles de comprobar experimentalmente y sobre los que no vamos, por lo tanto, a insistir más.

Continúa, pues, planteada la disponibilidad de métodos cuantitativos de determinación directa de fosfomonoesterasas, comparables por su sencillez con los fundados en el empleo como sustrato del *para*-nitrofenilfosfato sódico y del fenilftalaeinfosfato sódico (2), y por ello hemos prestado atención en este trabajo al método propuesto por MONCHE (4), con miras a su aplicación general para la microdeterminación directa de la fosfatasa sérica, que permite el estudio de las fosfatasas ácidas y alcalinas, a la temperatura del laboratorio y en condiciones de sensibilidad y suavidad manifiestas.

Nos hemos propuesto estudiar en el presente trabajo la influencia ejercida por el tiempo de obtención del suero sanguíneo y por el de obtención de la sal de diazonio en la diferencia entre las densidades ópticas correspondientes, respectivamente, al sistema hidrolítico fosfatásico con suero activo y al de hidrólisis química del éster solo, de una parte, y a la misma diferencia, obtenida de modo similar previa adición de suero inactivado al éster sólo. De la magnitud de estas diferencias depende la sensibilidad del método (6).

Material y métodos

Hemos operado con muestras de suero humano procedentes de sangre recién extraída. En cuanto la sangre se coagula, se obtiene inmediatamente el suero por centrifugación. Muestras de suero así resultante se guardan en la nevera para examen posterior comparativo. La sal de diazonio también la hemos guardado en la nevera para idéntico fin.

Para detener los procesos fosfatásicos correspondientes hemos recurrido a la adición de ácido clorhídrico normal en los

tubos de realización de los mismos, al proceder a su examen fotocolorimétrico. Las lecturas las hemos efectuado a pH 5 y 6, de inactivación de la fosfatasa sérica alcalina.

Los procesos fosfáticos los hemos realizado operando a pH=8, mediante la mezcla amortiguadora de ácido bórico y borato sódico de Clark-Lubs, a concentraciones 0'2 M e incubados a la temperatura ambiente de 15° C Los hemos detenido a los ocho y doce minutos de iniciados, respectivamente (7).

Para el examen fotométrico empleamos el fotocolorimétrico Evans de lectura directa, utilizando un filtro azul.

Damos a continuación algunos resultados de los de la serie obtenidos por nosotros, que estimamos más demostrativos (*).

RESULTADOS OBTENIDOS

T	P	Densidades ópticas			Controles b - c	Actividad fosfática a - b
		a	b	c		
I	8	33	21	17	4	12
	12	43	28'5	24	4'5	14'5
II	8	33	21	17	4	12
	12	43	28'5	24	4'5	14'5
III	8	26	22	17	5	4
	12	33	29'5	24	5'5	3'5

T = Tiempo en minutos.

a = éster + suero normal.

P = pH del líquido al detener el proceso fosfático.

b = éster + el mismo suero, pero inactivado.

c = éster sólo.

ENSAYOS

I y II = El mismo suero fresco, procedente de sangre recién extraída.

III = Idem veinticuatro horas después, conservado en la nevera.

(*) En algunos sueros, como el del caso presente, hemos observado una pérdida excepcionalmente rápida de la actividad fosfática, aun hallándose éstos en la nevera; pérdida atribuible al propio suero, dada la forma invariable de obtención de las muestras examinadas por nosotros.

Discusión

Los resultados expuestos permiten apreciar la pérdida de actividad fosfatásica del suero sanguíneo al no ser éste reciente; pérdida muy importante conforme puede observarse mediante la sensibilidad del presente método, puesto que basta el transcurso de veinticuatro horas, desde la extracción de la sangre e inmediata obtención del suero, para que la actividad fosfatásica del mismo se halle ya muy disminuída, según los sueros.

El pH de interrupción del proceso fosfatásico no ejerce, prácticamente, influencia apreciable en la densidad óptica del líquido examinado, dentro de los valores expuestos. Valores muy bajos del pH (inferiores a 3) determinan variaciones en la densidad óptica del medio, debidas a fenómenos de floculación parcial de la seroalbúmina, y de ligero viraje simultáneo del color del líquido.

La sal de diazonio se conserva perfectamente inalterada en la nevera durante dos días. Mayor permanencia determina una pérdida de su actividad.

Agradecemos al doctor MONCHE sus orientaciones para la realización de este trabajo.

Resumen

Se estudia la influencia del tiempo de extracción de sangre humana en la actividad de la fosfatasa sérica alcalina, mediante el éster 2,4'-carboxilazobenceno fosfórico como sustrato. Los resultados obtenidos se discuten sobre la base de la sensibilidad de este sustrato que permite apreciar muy claramente la pérdida de actividad fosfatásica del suero, según el tiempo transcurrido desde su obtención y conservación en la nevera.

Summary

The influence of the alkaline phosphatase activity of human blood serum depending of the extraction time of the blood, is studied by means of the ester 2,4'-carboxilazobenzene phosphoric, as substrate. The results obtained are discussed on the basis of the sensitiveness of this substrate, which enables to appreciate very clearly the rapidly lost of phosphatase activity of serum, after the obtention and conservation of the same in the ice-box.

Bibliografía

- (1) KAPLAN, A., y NARAHARA, A.: *Journ of Lab. and clinic Med.*; **41**, 819, 1953.
- (2) KING, E. J.: *Journ. of Pathol. and Bacteriol.*; **55**, 311-314, 1943.

- (3) MONCHE, J. y FERRER ARENILLAS, M. : *R. esp. Fisiol.*; **9**, 91-103, 1953.
- (4) MONCHE, J. : *Anales R. Sdad. Esp. Fís. y Quím.*; **48-B**, 499-522, 1952.
- (1) Id. y FERRER ARENILLAS, M. : *R. esp. Fisiol.*; **8**, 143, 1952.
- (5) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*; **37**, 317-323, 1955.
- (6) MONCHE, J. : *Anales R. Sdad. Esp. Fís. y Quím.*; **48-B**, 521-522, 1952.
- (7) MONCHE, J. y FERRER ARENILLAS, M. : *R. esp. Fisiol.*; **9**, 101, 1953 (figura 2).