

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Agregación de Química Enzimológica  
Escuela de Agricultura. — Barcelona

## Estudios sobre la riqueza en grupos funcionales activos de las proteínas séricas

por  
J. Monche (\*)

(Recibido para publicar el 13 de diciembre de 1956)

Los métodos de localización y estudio histológico de la distribución de esterasas, fundados en someter las preparaciones histológicas a la acción de los arilfosfatos o de los arilacetatos, en presencia de una sal de diazonio, han sido ampliamente discutidos por nosotros y hemos demostrado que la intensidad de la coloración de los cortes, no depende de la riqueza de los mismos en esterasas, sino del número de grupos funcionales amino terminales libres, entre otros grupos funcionales proteicos, existentes en dichas preparaciones, y que determinan la formación, por diazorreacción, de una capa de colorante azoproteico en la superficie del corte, de tal modo que los arilfosfatos o arilacetatos presentes, no intervienen en los procesos correspondientes (8).

No es extraño, sin embargo, que por otros autores se haya atribuido esta coloración de los cortes histológicos a la fijación del colorante mono-oxiazoico, formado por reacción de la sal de diazonio con los substratos (arilfosfatos o arilacetatos), previamente hidrolizados por las esterasas, de tal modo que la coloración traduciría, por lo tanto, la riqueza enzimática del tejido, puesto que, de acuerdo con nuestros trabajos, se observa clara-

---

(\*) Este trabajo ha sido en su mayoría realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona y con él terminó nuestra actuación allí. Dedicamos, por lo tanto, un recuerdo de consideración y afecto al distinguido profesor y querido amigo, Dr. Jiménez-Vargas, por todo su apoyo durante el tiempo de nuestra permanencia en dicho Centro.

mente que la evolución del desarrollo de color en estos procesos de copulación de grupos funcionales proteicos con sales de diazonio estables, así como las condiciones óptimas de su ejecución práctica experimental, marcha de dichos procesos, y causas que influyen en ellos, muestran en general bastante paralelismo con las correspondientes a los procesos enzimáticos. Incluso los mismos agentes físicos y químicos enérgicos que actúan sobre estos últimos, determinan también inhibiciones más o menos acentuadas en la velocidad de formación del color, hasta impedir la, según la intensidad del tratamiento (9).

Concretándonos a las fosfomonoesterasas, como un caso particular que son de las esterazas, se conoce desde hace tiempo su naturaleza proteica y el hecho de poseer, a juzgar por sus propiedades, determinados grupos constituyentes activos, principalmente aminofuncionales (1 y 2). Por lo tanto, deben reaccionar con las sales de diazonio de modo similar a como lo hacen las proteínas tisulares, y con intensidad variable, dependiente principalmente de la actividad de dichos grupos constituyentes, conforme expusimos en un trabajo anterior (10).

### Material y métodos (\*)

#### a) PREPARACIÓN DE LA SAL DE DIAZONIO

Empleamos la sal de diazonio del ácido antranílico, preparada operando en la forma expuesta con todo detalle en dos trabajos anteriores (11). Inmediatamente antes de utilizarla la neutralizamos a  $\text{pH} = 7$ , aproximadamente, por adición de 0,2 c. c. de una disolución 0,5 N de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , a una disolución de 1,25 c. c. de la sal de diazonio, diluída con 8,55 c. c. de agua destilada, de modo que el volumen total es de 10 c. c. Operamos al efecto en un tubo de ensayo, introducido en un baño de agua y hielo machacado.

#### b) PRÁCTICA DE LA OPERACIÓN

Una serie de tubos fotométricos (empleamos los del fotocolorímetro Evans, de lectura directa), se llenan hasta cerca de su enrase (6,5 c. c.), con 5,1 c. c. de la mezcla amortiguadora de CLARKS y LUBS, para los procesos efectuados a  $\text{pH} = 7,5$ ,

---

(\*) En la realización de la parte experimental de este trabajo nos ha prestado inteligente ayuda la señorita Marina Alvarez, afecta a los servicios de la cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina.

o con la de MICHAELIS y KRÜGER, para los realizados operando a  $\text{pH} = 6,5$ ; ambas mezclas amortiguadoras obtenidas a concentraciones 0,2 molares. Todos los tubos de la serie se mantienen a la temperatura de  $15^\circ \text{C}$ , para los ensayos efectuados a  $\text{pH} = 7,5$ , o a la de  $20^\circ \text{C}$ , si se opera a  $\text{pH} = 6,5$ , mediante los correspondientes baños termostáticos.

A continuación se introduce en ellos 1 c. c. de suero sanguíneo humano diluído 1/5, con agua destilada. El suero así diluído se utiliza directamente, en unos tubos, o bien el mismo, pero previamente calentando dicha disolución al 1/5, introduciéndola en un baño maría mantenido a  $80-90^\circ$ , durante media hora, de modo que la temperatura del contenido de cada tubo alcance los  $80^\circ \text{C}$ . El líquido obtenido debe ser casi completamente transparente (\*). Todos los sueros se emplean muy frescos, seguidamente después de extraídas las muestras de sangre correspondientes.

Se tendrán también preparados unos tubos llenos tan sólo con 6,1 c. c. de mezcla amortiguadora y dispuestos en las restantes condiciones idénticas.

Acto seguido se introduce en cada tubo de los de la serie, 0,4 c. c. de la disolución diluída de la sal de diazonio. Se agita simultáneamente el contenido de cada tubo y se empiezan a contar los tiempos al terminar la agitación. Los demás detalles operatorios son los mismos ya expuestos por nosotros en dos trabajos anteriores (12).

La lentitud de este proceso de copulación, que se observa perfectamente en la Figura 1, en la que es de notar la escasa diferencia entre las densidades ópticas iniciales, no corregidas al efecto, permite realizar cómodamente las determinaciones fotocolorimétricas. Después de una serie de ensayos de puesta a punto del método, realizamos los procesos correspondientes a todos y cada uno de los tubos, dejándolos en el baño termostático durante media hora, para efectuar seguidamente las lecturas fotocolorimétricas.

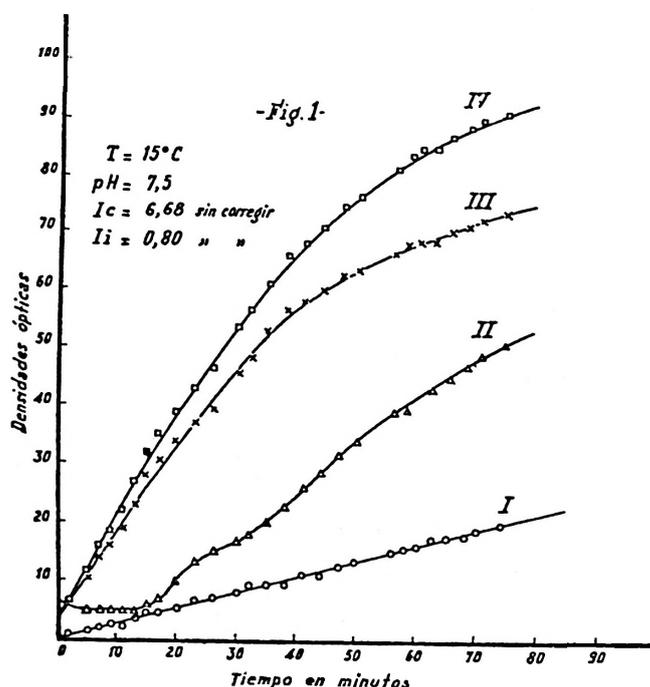
Antes de la adición de la sal de diazonio en cada tubo, se determina la densidad óptica correspondiente a su contenido, a fin de restarla de la final resultante, a la media hora indicada, corrigiéndose así las diferencias, y especialmente las debidas al suero inactivado.

---

(\*) Con sueros patológicos, hemos observado en algún caso, excepcionalmente, una turbidez notable.

## c) RESULTADOS OBTENIDOS

Las gráficas de la figura 1, muestran las diferentes velocidades de copulación del suero activo (curva IV) y del mismo suero, inactivado por calefacción en la forma expuesta precedentemente (curva II). Ambas curvas corresponden a las respectivas variaciones de la densidad óptica, en función del tiempo, lo mismo que la curva I, que representa, por lo tanto, la



velocidad de descomposición de la sal de diazonio, dependiente de la temperatura y del pH del medio, en las restantes condiciones operatorias. A  $pH = 6,5$ , la estabilidad de la sal de diazonio aumenta, de tal modo que es necesario operar a  $20^{\circ}C$ , para la práctica de los procesos de copulación correspondientes, a fin de efectuarlos a intervalos de tiempo similares, en la forma expuesta más adelante.

La curva III, es la de variación de las diferencias entre las respectivas densidades ópticas de las curvas IV y I, en función del tiempo.

Al principio de la curva II, se aprecia una disminución de la densidad óptica, probablemente debida a fenómenos de adsorción del color formado en la descomposición inicial de la sal

de diazonio. Esta disminución inicial de la densidad óptica, la hemos observado corrientemente en los sueros inactivados por el calor, operando en la forma expuesta en este trabajo.

Llamamos índice de copulación ( $I_c$ ), al cociente de dividir la densidad óptica de la mezcla reaccionante de la sal de diazonio con el suero activo (DSA), por la densidad óptica del compuesto diazoico testigo (DCD), a los treinta minutos de iniciado el proceso. Denominamos índice de inactivación ( $I_i$ ) al cociente de la división entre DSA — DSI y DSA — DCD, en igual intervalo de tiempo, siendo DSI la densidad óptica de la mezcla de la sal de diazonio con el suero inactivado; todo ello después de restadas las densidades ópticas iniciales correspondientes, antes de la adición de la sal de diazonio, conforme ya hemos expuesto al fin del epígrafe precedente. Por lo tanto, se tendrá:

$$I_c = \frac{DSA}{DCD} ; \quad I_i = \frac{DSA - DSI}{DSA - DCD}$$

Valores muy grandes del índice de copulación, corresponderán, por consiguiente, a sueros muy activos. En sueros totalmente inactivados por el calor, resultará DCD = DSI (corregida), o sea  $I_i = 1$ .

Los valores medios de muestras de veintidós sueros procedentes del Servicio de Transfusiones fueron (\*):

$$1) \text{ pH} = 7,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 3,30 \\ I_i = 0,60 \end{array} \right. ; \quad \text{pH} = 6,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 1,98 \\ I_i = 0,72 \end{array} \right.$$

A medida que DSI aumenta, DSA — DSI disminuye y, por lo tanto,  $I_i$  disminuye, puesto que DCD permanece prácticamente invariable, de unos ensayos a otros, al efectuarlos en la identidad de condiciones operatorias expuestas.

En los sueros patológicos (\*\*) se observan valores muy dispares; así, por ejemplo, en una misma muestra de cada uno de los sueros 2), 3), 4), resultó:

$$2) \text{ pH} = 7,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 3,02 \\ I_i = 1,00 \end{array} \right. ; \quad \text{pH} = 6,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 1,09 \\ I_i = 1,00 \end{array} \right.$$

(\*) Agradecemos al profesor García Valdecasas las facilidades que nos ha dado para disponer de muestras de suero de dicho Servicio.

(\*\*) Los sueros patológicos procedían de las clínicas de la Facultad de Medicina de Barcelona. Los casos expuestos en este trabajo los hemos seleccionado de los de la serie de sueros que consideramos más demostrativos.

$$\begin{array}{l}
 3) \text{ pH} = 7,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 4,43 \\ I_i = 0,50 \end{array} \right. ; \text{ pH} = 6,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 1,17 \\ I_i = 0,89 \end{array} \right. \\
 4) \text{ pH} = 7,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 2,79 \\ I_i = 0,51 \end{array} \right. ; \text{ pH} = 6,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 2,65 \\ I_i = 0,46 \end{array} \right.
 \end{array}$$

#### a) DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASEMIA

Los sueros procedentes del Servicio de Transfusiones, mostraban una fosfatasemia normal. Los sueros *b)*, *c)*, *d)*, dieron los valores siguientes, por el método de King (7) :

Sueros	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
2)	6,2 unidades	1,7 unidades
3)	18,9 »	6,8 »
4)	5,3 »	21,4 »

El suero de las gráficas de la figura 1 dió 24,6 unidades de fosfatasa alcalina, por el mismo método.

#### b) ACCIÓN DE LAS SALES MAGNÉSICAS

Añadimos a los tubos testigo que contienen solamente la sal de diazonio, y a los que contienen la mezcla de dicha sal con el suero activo e inactivo, respectivamente, 0,05 c. c. de una disolución 0,1 M de cloruro magnésico. La media de los valores obtenidos de muestras de diez sueros suministradas por el Servicio de Transfusiones fué :

$$5) \text{ pH} = 7,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 3,12 \\ I_i = 0,58 \end{array} \right. \quad \text{pH} = 6,5 \left\{ \begin{array}{l} I_c = 2,65 \\ I_i = 0,46 \end{array} \right.$$

### Discusión

Los métodos de localización y estudio de la distribución de esterasas en tejidos, fundados en la acción de una sal de diazonio sobre los substratos (arilfosfatos o arilacetatos), previamente hidrolizados por las esterasas tisulares, y discutidos por nosotros, conforme hemos expuesto al principio de este trabajo, se aplican en histopatología (13). Es, pues, evidente que

existen grandes diferencias de comportamiento entre los tejidos sanos y los patológicos, al someterlos a la acción de las sales de diazonio.

Pero toda evolución tisular anormal, sea proliferante o destructiva, representa evidentemente alteraciones metabólicas más o menos intensas y profundas, que repercuten en la composición normal de la sangre.

Comparando los valores medios de los índices de copulación y de inactivación de los sueros que consideramos como químicamente normales 1), con los de los sueros patológicos 2), 3), 4) y figura 1, se observan grandes diferencias.

Se halla sobradamente divulgada la gran capacidad de reacción de las sales de diazonio con sustancias diversas, especialmente con las de función amina, incluso las heterocíclicas, y con las de función OH y SH. Y una de las sustancias biológicas más conocidas, por su determinación analítica fundada en la formación de un azocolorante con la sal de diazonio del ácido sulfanílico (reactivo de Ehrlich), dada la gran sensibilidad del método, es precisamente la bilirrubina, conforme es sabido. Pero este mismo reactivo también se utiliza en reacciones de copulación con las proteínas, para identificar la albúmina en ciertas condiciones patológicas (3).

La presencia en el suero sanguíneo de sustancias tales como la bilirrubina, aun en pequeña proporción, aumentarán, por lo tanto, el índice de copulación y disminuirán el índice de inactivación.

En algunos sueros, como en el del caso 2), se observa un índice de inactivación igual a la unidad, lo que quiere decir que se inactivan totalmente por la acción del calor, hasta el extremo de no dar reacción alguna con la sal de diazonio. Y este comportamiento, interesantísimo bajo todos conceptos, caso de confirmarse con carácter general en otros trabajos que tenemos en curso, nos permite descartar la acción de los factores no proteicos, como, por ejemplo, la de la bilirrubina.

Un índice de inactivación bajo, debe representar, por lo tanto, la presencia en la sangre de sustancias no proteicas, no termolábiles, y copulables con la sal de diazonio. Precisamente y en relación con esto último, tiene interés, en nuestro concepto, la comparación de los valores obtenidos en las determinaciones de fosfatasemia con los sueros 2), 3), 4) y con el de la figura 1: mientras que el suero 2) presenta una fosfatasemia ácida y alcalina normal, que es real y efectiva, puesto que  $I_1 = 1$ ; los sueros 3) y 4) muestran valores de fosfatasemia, alcalina el primero y ácida el segundo, que exceden considerablemente de la normalidad. En ambos, los índices de

inactivación correspondientes a  $\text{pH} = 7,5$  y  $6,5$ , respectivamente, son muy bajos, y ello puede interpretarse en parte, como dos casos de fosfatasemia aparente, similares a los que han sido objeto de atención por nosotros, en un trabajo anterior (14), y sin que ello sea una regla general, puesto que el suero 4) presenta una fosfatasemia alcalina normal, a pesar de tener un índice de inactivación bajo a  $\text{pH} = 7,5$ .

En cambio, la fosfatasemia alcalina elevada del suero de la figura 1, es muy notable, puesto que muestra un índice de inactivación a  $\text{pH} = 7,5$ , de  $0,80$ , y, por lo tanto, bastante alto. Aunque en este caso el valor de dicho índice es sin corregir, la influencia del suero activo e inactivado en las correspondientes densidades ópticas, se aprecia en las curvas de la figura 1.

De la comparación de los sueros 3) y 4), resulta que a  $\text{pH} = 7,5$  y no obstante tener un índice de inactivación similar, el índice de copulación del primero es considerablemente mayor que el del segundo. Casos parecidos los hemos observado en otros sueros, incluso operando a  $\text{pH} = 6,5$ . Y esta distinta velocidad de copulación de la sal de diazonio, con todo y operar en mezclas amortiguadoras, sólo puede interpretarse en nuestro concepto, aislada o globalmente, con arreglo a cualquiera de los siguientes hechos :

1.º La existencia en el suero de sustancias termolábiles, capaces de actuar catalíticamente como activadores del proceso de copulación.

2.º La existencia de sustancias copulables, asimismo termolábiles, pero de pequeño tamaño molecular, puesto que la velocidad de copulación y el tamaño de las moléculas copulables con los compuestos diazoicos, se hallan en razón inversa, conforme es sabido, en identidad de condiciones experimentales.

3.º La existencia de sustancias termolábiles, de cualquier tamaño molecular, pero caracterizadas por poseer en su molécula numerosos grupos funcionales activos ( $-\text{NH}_2$ ;  $=\text{NH}$ ;  $-\text{OH}$ ;  $-\text{SH}$ ); lo que determinaría en ellas un aumento muy considerable de su velocidad de copulación con las sales de diazonio. Esta última hipótesis es perfectamente compatible con la segunda, conforme se comprenderá, puesto que lo que cuenta al efecto es la concentración de grupos activos presentes en el sistema en que el proceso ocurre.

Y de todos los posibles componentes del suero sanguíneo capaces de reunir conjuntamente estas propiedades, ninguno

resalta tanto como las proteínas séricas, en sueros normales y patológicos, dada la complejidad de la molécula proteica, por la variedad de aminoácidos constituyentes y de distinto tamaño molecular que pueden integrarla, conforme es sabido. Por otra parte, los grupos activos mencionados se caracterizan precisamente por su gran polaridad, como constituyentes de las moléculas proteicas, de influencia considerable en el carácter eléctrico de las mismas y en el de los compuestos con ellas formados.

#### INFLUENCIA DEL pH

Ha sido muy estudiada la influencia extraordinaria ejercida por el pH del medio en la velocidad de copulación de las sales de diazonio de las combinaciones aromáticas, que depende de la naturaleza del núcleo del compuesto diazónico, por el número y carácter eléctrico de los substituyentes presentes, así como de la naturaleza y carácter eléctrico de la substancia a copular (4).

No cuesta mucho imaginarse un ion coloidal proteico en el seno de una mezcla amortiguadora y las acciones de catálisis ácido-base que aun en estas condiciones es capaz de provocar por fenómeno de superficie, constituyendo así un caso particular de la catálisis ácido-base en sistema heterogéneo. El pH del medio puede ser incluso de 7 y ocurrir dicha acción catalítica, precisamente por tratarse de un sistema heterogéneo, y porque el pH que se determina corrientemente en los laboratorios es el del medio de dispersión, pero no el del punto isoeléctrico de la fase dispersa (\*).

En cuanto a la acción del ion magnesio en los procesos de copulación azo-proteicos, se observa una activación de los mismos en los sueros 5), por comparación con los sueros 1). Dicha activación es especialmente notable operando a  $\text{pH} = 6,5$  y se observa también a  $\text{pH} = 7,5$ , a juzgar por la disminución del valor del índice de inactivación; pero las sales magnésicas pueden formar combinaciones en los procesos de este tipo (5).

Tenemos actualmente en estudio la aplicación a estos trabajos del cloruro de 1-antraquinondiazonio, por su gran estabilidad, y que venimos utilizándolo desde hace tiempo (8). Pero la puesta a punto del método es laboriosa, sin bien el empleo de dicha sal ha de aumentar las posibilidades de estudio de estos procesos, para poderlos juzgar con mayor base experimental, al hacerlos extensivos a diversas proteínas de distinto

---

(\*) El punto isoeléctrico de las distintas proteínas se halla situado al pH más diverso; con frecuencia oscila alrededor de 5, pero raramente adquiere valores próximos a 7. Lo mismo ocurre, de modo similar, con el de otros coloides (6).

origen, dadas las facilidades de trabajo y manipulación que ofrece este cloruro de antraquinondiazonio.

#### APLICACIÓN DE ESTAS IDEAS A LOS PROCESOS FOSFOMONOESTERÁSICOS

También las ideas expuestas son aplicables a los procesos fosfomonoesterásicos, puesto que constituyen, en nuestro concepto, el mismo caso especial de catálisis ácido-base, en sistema heterogéneo, dada la naturaleza proteica de las fosfomonoesterasas. A mayor abundamiento, desde los trabajos de ROCHE y BOUCHILLOUX, quienes al no poder identificar la existencia de coenzima alguno en la fosfatasa alcalina de intestino, llegaron a la conclusión de que la fosfatasa por ellos obtenida era sólo una proteína (16), se va generalizando el criterio de dichos autores.

Precisamente y desde hace tiempo, venimos considerando a las esterasas, no como agentes catalíticos propiamente dichos, sino como verdaderos activadores de un proceso de hidrólisis ya de por sí catalizado, gracias al pH del medio (15). Y sobre el posible mecanismo de esta autocatálisis, el estudio de los procesos de catálisis ácido-base en sistema heterogéneo, ofrece en nuestro concepto, amplias perspectivas a la investigación.

#### Resumen

En trabajos anteriores efectuados por el autor se demuestra que los métodos de coloración de cortes histológicos fundados en la reacción de una sal de diazonio con un sustrato (arilfosfato o arilacetato) previamente hidrolizado por las esterasas presentes, no traducen la riqueza enzimática del tejido, porque el proceso no es enzimático, sino de simple tinción histológica, por diazorreacción de las proteínas tisulares con la sal de diazonio. En el presente trabajo se estudian ciertas analogías existentes entre estos procesos y los esterásicos, dependientes de las propiedades de la molécula proteica, como un caso especial de la catálisis ácido-base, en sistema heterogéneo.

#### Summary

Studies on the richness in active functional groups of the serum proteins

In previous papers, the author has evidenced that the methods of histochemical demonstration of esterases based in the coupling of a diazonium salt with a previously hydrolyzed arylester substrate, do not translate the enzymic localization in tissues, because all this azo-dye processes are not enzymatic.

A direct azo-coupling with the protein amino groups, and others active proteinic or protidic groups occurs, forming an azo-proteinic dye layer, in which the proteins of the tissue are integrated.

In the present paper, this proteinic azo-dye processes are studied, as a first step, in the normal and pathological human blood serum, and certain analogies of same with the esterase processes are evidenced by the author, as a particular case of an acid base heterogeneous catalysis.

The above mentioned enzymic azo-dye methods, are specially utilized in histopathology and the author has demonstrated, in previous papers, that the azo-proteinic dye layers, formed in the surface of the histological cuts, can be suitable for the histopathological studies.

In the same way, the chemical pathological changes in the composition of blood serum, can be followed colourimetrically, by means of an azo-proteinic dye method studied in this paper, and based on the determination of the coupling and inactivation index of serum proteins.

For this purpose the author has utilized the diazonium salt of anthranilic acid prepared as it has been described in two previous papers (11). For the use of this diazonium salt, the corresponding solution is immediately neutralized to pH = 7, or nearly, as it is described in this paper.

The human blood serum is diluted with water to 1/5 and a half part of this solution is gently warmed in a water bath to 80-90° C. Practically no turbidity is commonly observed in normal serums, but the corresponding optical densities of warmed and unwarmed diluted serums must be nevertheless determined in the experimental conditions described in this paper, in order to be taken in account for their correction.

Warmed diluted serum do not react commonly with the diazonium salt, or at least the intensity of the colour of the non proteinic azo-dye formed is very weak. Only in icteric warmed diluted serums the intensity of the colour is considerably increased.

Working in the experimental conditions described in this paper, the author calls coupling index ( $I_c$ ) and inactivation index ( $I_i$ ) to:

$$I_c = \frac{DSA}{DCD} ; \quad I_i = \frac{DSA - DSI}{DSA - DCD}$$

DSA, is the optical density of the reaction mixture, composed by the diazonium salt and unwarmed diluted serum.

DCD, is the optical density of the diluted diazonium salt.

DSI, is the optical density of the mixture composed by the diazonium salt and warmed diluted serum.

Great values of the copulation index will correspond by consequence at the very active serums. In serums wholly inactivated by warming, will result  $DCD = DSI$  (corrected), or what is the same:  $I_i = 1$ .

Several experimental data of normal and pathological human blood serums, are reported by the author.

### Bibliografía

- (1) DELORY, G. E. y KING, E. J. : *Biochem. J.*, **37**, 547-550, 1934.
- (2) GOULD, B. S. : *J. Biol. Chem.*, **156**, 365-371, 1944.
- (3) GILSON, A. : *Traité Chim. Org.* (Grignard), **15**, 224 (Masson, Paris 1948).
- (4) GILSON, A. : *Traité Chim. Org.* (Grignard), **15**, 283-284 (Masson, Paris 1948).
- (5) GILSON, A. : *Traité Chim. Org.* (Grignard), **15**, 123-126 y 409 (Masson, Paris 1948).
- (6) JÖRGENSEN, H., y SÖRENSEN, S. P. L. : *Théorie, Mesure et Applications du pH*, 238-241 (Dunod, Paris 1938).
- (7) KING, E. J. : *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, 56-61 (Churchill, Ltd., London 1946).
- (8) MONCHE, J. : *Actas I Reunión Nacional Sdad. Española Ciencias Fisiológicas*, 127-128, 1953; *Annales Biologie Clinique*, **12**, 553-559 (Paris, 1954); III.º Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications, page 75 (Bruxelles, 1955); *R. esp. Fisiol.*, **11**, 211-218, 1955. Id. MONCHE, J., y GALOFRÉ, M. : *Actas III Reunión Nacional Sdad Española Ciencias Fisiológicas*, mayo de 1956 (en prensa).
- (9) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 216 y 217, 1955.
- (10) MONCHE, J. : *Actas III Reunión Nacional Sdad. Española Ciencias Fisiológicas*, mayo 1956 (en prensa).
- (11) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 318, 1955; *R. esp. Fisiol.*, **11**, 302, 1955.
- (12) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 317-321, 1955; *R. esp. Fisiol.*, **11**, 301-303, 1955.
- (13) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 217, 1955, bibliografía citada.
- (14) MONCHE, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J., y FERRER-ARENILLAS, M. : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 219-223, 1955.
- (15) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **7**, 229 y 230, 1951.
- (16) ROCHE, J., y BOUCHILLOUX, S. : *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 572, 1953.