

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

Acción del ácido cianhídrico y sus dos formas tautómeras sobre las fosfomonoesterasas (*)

por J. MONCHE, J. JIMÉNEZ-VARGAS y A. SOLS

Admitido que el cianuro potásico se comporta como inhibidor de la actividad de las fosfomonoesterasas, nos planteamos en este trabajo el problema del mecanismo de su acción inhibidora.

El cianuro potásico se hidroliza en disolución acuosa, según es sabido, con formación de moléculas no disociadas de ácido cianhídrico, dada la extraordinaria debilidad de dicho ácido. La indicada hidrólisis es particularmente intensa en las condiciones en que se le emplea como inhibidor fosfatásico (HARMAN y WORLEY (1)).

Las propiedades del ácido cianhídrico le sitúan entre los nitrilos y las carbilaminas. Tanto que se le considera como una mezcla en equilibrio de las dos siguientes formas tautómeras, que después discutiremos:



Según la estructura (I), y comparando sus propiedades físicas con las de los nitrilos, se le considera como el nitrilo del ácido fórmico o formonitrilo. Se comporta hidrolíticamente del mismo modo que los nitrilos, pero en cambio su calor de combustión, sus propiedades explosivas y sus reacciones orgánicas, le aproximan a las carbilaminas.

(*) Comunicación presentada en el XVII Congreso Internacional de Fisiología, en Oxford (Inglaterra), el 22 de Julio de 1947.

De acuerdo con lo que acabamos de exponer, las disoluciones acuosas de cianuro potásico contendrán las dos formas tautómeras en equilibrio de referencia, correspondientes a las moléculas no disociadas del ácido cianhídrico, formado por hidrólisis.

Suponíamos nosotros, como hipótesis de trabajo, que la acción inhibitoria de la actividad fosfatásica ejercida por el cianuro potásico, habría de estar íntimamente relacionada con la presencia de una de estas dos formas tautómeras. Para llegar a conclusiones ciertas deberíamos haber empleado separadamente cada una de las dos formas; pero, dada la imposibilidad fundamental de aislarlas, hemos tratado de resolver el problema de una manera indirecta. Por eso, estudiamos comparativamente el cianuro potásico, el acetonitrilo y la metilcarbilamina y ensayamos la acción inhibitoria de estos compuestos sobre la actividad fosfatásica, operando en identidad de condiciones experimentales.

Elegimos la metilcarbilamina y el acetonitrilo, para comparar su actividad con la del cianuro potásico, porque son dos isómeros que corresponden enteramente a cada una de las dos formas tautómeras del ácido cianhídrico. Sólo se diferencian de este último por la presencia del grupo metilo, que substituye al respectivo átomo de hidrógeno. Por eso, la influencia de este grupo ha de ser completamente análoga en los dos isómeros.

El estudio comparativo de estos compuestos tiene especial interés por las particularidades de su estructura química, que más adelante consideraremos, pero este interés estriba también en que sus propiedades biológicas han sido muy poco estudiadas, ya que no encontramos en la bibliografía más referencias que los datos sobre su toxicidad comunicados por GAUTIER (2), CALMELS (3) y FALK (4).

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de fosfatasas. — Seguimos la técnica de ALBERS (5). Obtenemos preparados de hígado, riñón, hueso, bazo, cerebro e intestino delgado. Hemos utilizado perros adultos.

Los rendimientos de producto final precipitado en función del material de partida son los siguientes:

Material	Cantidad inicial	Producto precipitado	Porcentaje	Aspecto
Hígado	900 grs.	3,3560 grs.	0,37 %	Polvo color terroso.
Riñón	170 »	0,5391 »	0,31 %	Polvo amarillento.
Huesos	470 »	0,9160 »	0,19 %	Id. id.
Bazo	115 »	0,2406 »	0,20 %	Id. id.
Cerebro	168 »	0,3126 »	0,10 %	Polvo blanco
Intestino delgado	1.000 »	0,9578 »	0,095 %	Id. id.

Estudiamos la actividad de estos preparados, obtenidos en forma pulverulenta, previa dispersión de los mismos en suero fisiológico. Para la determinación cuantitativa de fosfomonoesterasas seguimos el método de uno de nosotros (SOLS (6)).

Los resultados obtenidos, correspondientes a fosfatasa alcalina (pH = 9,4) y ácida (pH = 5,0) — A₁ y A₂ de FOLLEY y KAY —, expresados en miligramos liberados por gramo y operando en presencia de Mg⁺⁺0,01 M., son los siguientes:

Material	A ₁ mgr. P/gr.	A ₂ mgr. P/gr.	A ₁ /A ₂
Hígado	64,8	33,5	1,9
Riñón	82,2	20,0	4,1
Hueso	87,0	7,6	11,4
Bazo	42,0	32,0	1,3
Intestino	146,0	19,1	7,6
Cerebro	139,0	38,4	3,6

En el preparado precedente de intestino se observa una cierta actividad en medio ácido, aunque considerablemente inferior a la apreciada en medio alcalino. En vista de ello ensayamos su comportamiento en presencia de taurocolato sódico M/100; con lo que hemos conseguido la confirmación experimental de su origen al observar una inhibición ligera en medio alcalino (del 16 %) y nula o muy ligera activación en medio ácido (LÓPEZ NAVARRO (7)).

Acetonitrilo y metilcarbamilamina. — Hemos empleado acetonitrilo Merck cuidadosamente rectificado por nosotros mediante destilación (P. E. = 80 — 81,5° C). Obtuvimos la metil-

carbilamina por el método de GAUTIER (8), a partir del cianuro de plata y del yoduro de metilo. Este método da rendimientos prácticamente cuantitativos (BRUYLANTS (9)). Antes de emplearla la rectificamos por cuidadosa destilación (P. E. = 58 — 59° C), mediante una columna de fraccionar. Utilizamos en cada tratamiento la menor cantidad posible de producto, a fin de disminuir los riesgos de descomposición explosiva del mismo (LEMOULT (10)).

La metilcarbilamina como el acetonitrilo son solubles en agua; por eso es fácil su empleo para el estudio experimental cuantitativo. La estabilidad de las carbilaminas es perfecta en medio acuoso o alcalino; en cambio, en medio ácido muy fácilmente se produce la descomposición hidrolítica de la metilcarbilamina a la temperatura ambiente y se forma la correspondiente formiamidina (GAUTIER (11)).

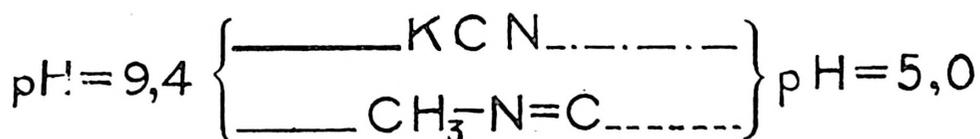
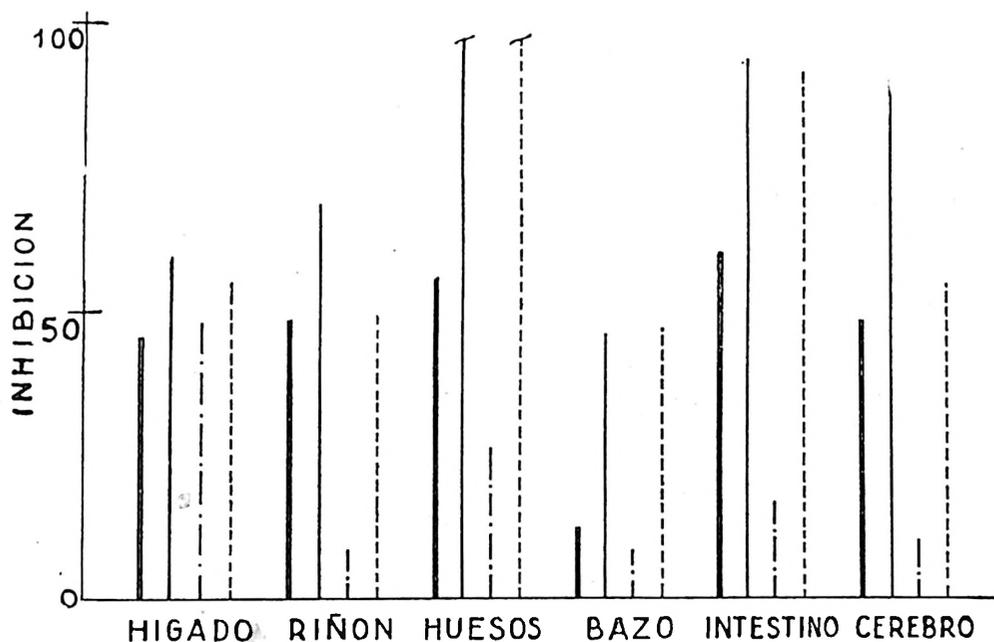
Hemos obtenido los resultados que representamos en la gráfica.

DISCUSION

Nuestros resultados demuestran una diferencia evidente entre las acciones que ejercen el cianuro potásico, la metilcarbilamina y el acetonitrilo. El acetonitrilo no tiene acción inhibitoria; la metilcarbilamina, por el contrario, inhibe fuertemente y su acción es más enérgica que la del cianuro. Todo esto está plenamente de acuerdo con la hipótesis más generalizada en la actualidad sobre la constitución del ácido cianhídrico: Se le considera como una mezcla en equilibrio de los dos isómeros mencionados al principio de este trabajo; pero con predominio de la forma isocianuro ($H - N = C$), según MICHAEL y W. HIBBER (12); J. F. THORPE (13); H. C. HETHERINGTON (14) y KURT MEYER y HOPFF (15). Hipótesis confirmada posteriormente mediante la espectrografía Raman (DADIEU (16) y LINDEMANN (17)) y también por HAMMICK, NEW, SIDGWICK y SUTTON (18). De acuerdo con los trabajos de estos últimos autores, como consecuencia de medidas de momentos eléctricos dipolares, se asignó al grupo funcional isocianuro (carbilamina) la siguiente estructura: $\text{---}\overset{+}{N} \rightleftharpoons \overset{-}{C}$ (III). Dicha estructura, caracterizada por el doble enlace semipolar, se ha confirmado experimentalmen-

Inhibición de fosfatasas purificadas, procedentes de varios órganos del perro, por el cianuro potásico, el acetonitrilo y la metilcarbilamina, a concentraciones M/100, en presencia de Mg^{++} M/100.

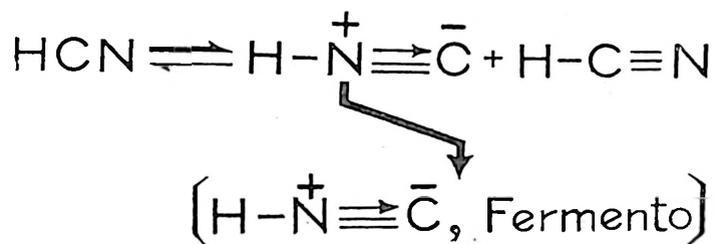
El acetonitrilo no ejerce influencia alguna.



te después, mediante las determinaciones de paracoros de sus derivados. En cambio, son más discutibles las estructuras: $\text{— N} \equiv \text{C}$ (II), de átomo de carbono divalente y también la $\text{— N} \equiv \text{C}$ (I), de átomo de nitrógeno pentavalente, que sólo aceptan DADIEU y KOHBRAUSCH (19). La estructura (III) representa la existencia de un proceso de ionización intramolecular del grupo isocianuro (carbilamina) con las correspondientes cargas eléctricas en los átomos C y N. Según esto, y teniendo en cuenta la naturaleza coloidal de las fosfomonoesterasas, pueden llegar a formarse entidades fisico-químicas con dichos fermentos, a modo de complejos isocianuro-fosfomonoesterasa. Tales complejos, por su manifiesta estabilidad serían la causa determinante del efecto inhibitorio ejercido por el cianuro potásico y la carbilamina. El complejo quedaría más o menos eliminado del sistema hidrolítico enzimático.

La mayor parte de todo el ácido cianhídrico formado hidrolíticamente, al hallarse constituido por moléculas no disociadas, determinará la existencia de las dos formas tautómeras de referencia. Lo que no es aplicable a los iones correspondientes a ambas, puesto que son idénticos: $[\text{N} \equiv \text{C}]^-$.

De acuerdo con cuanto antecede, formulamos la siguiente hipótesis del mecanismo de la inhibición de las fosfomonoesterasas por el ácido cianhídrico:



Bibliografía

1. HARMANN y WORLEY : *Trans. Faraday Soc.*, 20, 502 (1925).
2. GAUTIER : *Ann. Chim. Phys.*, 17, 218 (1869).
3. CALMELS : *Compt. Rend. Acad. Sciences*, 98, 536 (1884).
4. FALK : *Virchows Archiv.*, 99, 164 (1885).
5. ALBERS : *Z. Physiol. Chem.*, 232, 165-188 (1935).

6. SOLS, A. y PONZ, F. : R. esp. Fisiol., 2, 283-384 (1946).
7. LÓPEZ NAVARRO, J. : R. esp. Fisiol., 2, 211-282 (1946).
8. GAUTIER : Ann. Chim. Phys. (4), 17, 215 (1822).
9. P. BRUYLANTS : Traité de Chimie Organique (V. Grignard), 13, 848 (1941).
10. LEMOULT : Comp. Rend. Acad. Sciences, 143, 903 (1906).
11. GAUTIER : Ann. Chim. Phys., 17, 203 (1869).
12. MICHAEL y HIBBER, W. : J. Am. Chem. Soc., 304, 64 (1908).
13. THORPE, J. F. : Bull. Soc. Chim. France, 33, 1345 (1923).
14. HETHERINGTON, H. C. : J. Am. Chem. Soc., 45, 824 (1923).
15. MEYER, KURT y HOPFF : Ber. 54-B, 1709 (1921).
16. DADIEU : Naturwiss, 43, 895 (1930); Ber., 63, 1657 (1930).
17. LINDEMANN : Ber., 63, 1650 (1930).
18. HAMMICK, NEW, SIDGWICK y SUTTON : J. Chem. Soc. (London), p. 1876 (1930).
19. DADIEU y KOHBRAUSCH : Ber., 63, 1657 (1930); Monatsh., 57, 437 (1931).