

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

Acción del hexaclorociclohexano y del D. D. T. sobre los procesos fosfatásicos

por J. Monche

(Recibida para publicar el 20 de febrero de 1950)

En trabajos anteriores (6) y (8) se han investigado en estos laboratorios las toxicidades comparativas del D.D.T. y de una mezcla de hexaclorociclohexanos isómeros (666), de elevada toxicidad, obtenida según un método nuestro (5).

En el presente trabajo y como una contribución inicial a un posible esclarecimiento del mecanismo de dicha acción, bastante similar a la del D.D.T., hemos estudiado comparativamente el efecto ejercido por este último y el 666, sobre los procesos fosfatásicos.

Dada la actualidad del tema y de las técnicas originales empleadas, adelantamos todo ello en esta nota previa, dentro de un plan a desarrollar en otros trabajos en curso.

Métodos

Utilizamos el D.D.T. y el 666 bruto (mezcla de isómeros de elevada toxicidad), debidamente purificados por recristalización en alcohol etílico, siendo sus puntos de fusión respectivos de 108-109° y de 146-153°.

Debido a la insolubilidad acuosa de ambos productos, operamos en emulsión oleosa para ensayar su acción sobre la fosfatasa alcalina de intestino, teniendo en cuenta que el pH óptimo del medio (9,4), permite emplear emulsiones perfectamente estables. Como agente emulsionante utilizamos una disolución 0,2 molar de bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), previa disolución de la

sal en caliente para enrasar después en frío con la cantidad de agua destilada necesaria en el matraz aforado correspondiente.

Empleamos aceite de almendras dulces purísimo, preparando con él respectivamente dos disoluciones de 1 gr. de D.D.T. y de 666 en 10 c. c. de aceite, mediante calefacción al baño maría.

Separadamente disponemos tres tubos de ensayo con 15 c. c. de la disolución 0,2 molar de bórax en todos ellos, para añadir después 1 c. c. de aceite puro, o de la disolución oleosa de D.D.T. y de 666, respectivamente en cada tubo. Al sacudirlos energicamente resultan tres finísimas emulsiones, por completo estables y de aspecto netamente lechoso.

Como fuente de fosfatasas empleamos un autolizado de intestino de rata blanca en 300 veces su peso de agua clorofórmica. Operamos a pH 9,4 mediante la mezcla reguladora de carbonato-bicarbonato sódicos propuesta por King (4).

Como sustrato utilizamos, además del fenolftalein-fosfato sódico, el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico, obtenido con otros ésteres similares de colorantes hidroxiazóicos, por primera vez, operando en condiciones que se expondrán detalladamente en otro trabajo (7). Ambos sustratos los empleamos partiendo de disoluciones de los mismos aproximadamente M/500.

El *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico, al igual que los otros ésteres aludidos de colorantes hidroxiazóicos, ofrece la interesante propiedad de ser hidrolizable por la fosfatasa operando a la temperatura ambiente, con rápida evolución del color. Las disoluciones de dicho éster son de color verde y viran al amarillo-rojizo, bajo la acción de la fosfatasa alcalina, liberándose el *meta*-toluil-azo-fenol.

Para la práctica de los ensayos correspondientes disponemos dos grupos de cuatro series de a tres tubos de ensayo por serie, o sea en total doce tubos por cada uno de ambos grupos.

Los dos grupos de experiencias las efectuamos trabajando en identidad de condiciones, salvo emplear como sustrato el fenolftaleinfosfato sódico en el primer grupo, a la temperatura de incubación de 37°, para ir observando la variación del desarrollo de color durante una hora. En el segundo grupo utilizamos como sustrato el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico, incubando a la simple temperatura ambiente, para ir observando la evolución del viraje del color durante el mismo tiempo. Teníamos además preparados los tres tubos mencionados en párrafos pre-

cedentes, que contienen respectivamente las emulsiones de aceite solo, de aceite con D.D.T. y de aceite con 666.

En todos los tubos añadimos 5 c. c. de la mezcla reguladora ya mencionada, 0,1 c. c. de la emulsión oleosa a ensayar y 1 c. c. del substrato correspondiente.

Los tres tubos de cada una de las dos primeras series de ambos grupos contenían la emulsión de aceite puro y además 1 c. c. de agua clorofórmica. En los de las segundas series sustituimos el agua clorofórmica por 1 c. c. del autolizado de intestino. Los de las terceras se hallaban dispuestos de modo idéntico a los de las segundas, salvo substituir la emulsión de aceite puro por la de aceite con D.D.T. ; finalmente los de las cuartas fueron también idénticos a los de las segundas, pero substituyendo en cambio la emulsión de aceite puro por la de aceite con 666.

En los tubos del primer grupo empleamos como substrato el fenoltaleinfosfato sódico y en los del segundo el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico ; este último incubando a la simple temperatura ambiente, conforme hemos hecho constar precedentemente.

Resultados

Operando con el fenoltaleinfosfato sódico como substrato, se observa claramente una débil inhibición de la actividad fosfatásica al comparar las intensidades finales del color desarrollado en los tubos que contienen la emulsión oleosa con D.D.T. y 666, respecto a los tubos con la emulsión oleosa de aceite puro. No se observan diferencias apreciables entre la inhibición provocada por ambas sustancias, ni aun durante el curso de la experiencia.

Mediante el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico como substrato, se aprecian en cambio diferencias muy acusadas al comparar de modo idéntico los tubos correspondientes, no sólo al fin del proceso, sino durante la evolución del mismo, por los virajes del color y tonalidades respectivas.

Mientras que en los tubos que contienen la emulsión oleosa de aceite puro se inicia la hidrólisis inmediatamente después de la adición del autolizado intestinal, virando el color paulatinamente del verde al amarillo-rojizo, pasando por el verde-amarillento y el amarillo pálido y completándose el proceso

en 18 minutos ; en los tubos que contienen la emulsión oleosa con D.D.T. y 666, permanece el color verde inalterado durante unos 9 y 16 segundos, respectivamente, y el proceso no cesa hasta transcurridos unos 23 minutos, manteniéndose siempre más lento en el caso del 666, cuyos tubos quedan por fin de color amarillo pálido, mientras que en los correspondientes al D.D.T. el color final es amarillo rojizo, menos intenso que el desarrollado en los tubos con emulsión oleosa de aceite puro.

Discusión

Según nuestras experiencias, ejerce a igualdad de peso una acción inhibitoria mucho más enérgica el 666 que el D.D.T., sobre la fosfatasa alcalina de intestino en las condiciones operatorias descritas.

Conforme se recordará, hemos partido inicialmente de disoluciones al 10 por 100 de D.D.T. y de 666 en aceite de almendras dulces, mas no en cambio de disoluciones de igual molaridad. Hemos tenido en cuenta al hacerlo que en los ensayos de toxicidad sobre animales se opera siempre en general partiendo de peses de substancia a investigar por kilo de peso de animal.

La mezcla reguladora parecía más lógico haberla elegido de borato de Clark, considerando que utilizamos disoluciones de bórax como agente emulsionante. Hemos preferido, sin embargo, la de carbonato-bicarbonato de King, no obstante ser también la de Clark bastante empleada desde hace tiempo (1), a fin de aproximarnos a condiciones de trabajo lo más fisiológicamente posibles.

Es un hecho ya conocido desde hace tiempo (2), que las fosfatasas hidrolizan con distinta velocidad los diferentes ésteres fosfóricos ; pero no sólo la velocidad de hidrólisis, sino incluso el pH óptimo, varían mucho según el éster empleado, aun tratándose de substratos tan relacionados entre sí como los ésteres *alfa* y *beta*-glicero-fosfóricos. Cambios mayores en la estructura del substrato llegan a provocar diferencias mucho más acentuadas, de tal modo que, por ejemplo, el fosfato de fenilo se hidroliza con doble velocidad que el glicero-fosfato y aun mucho más rápidamente que el fosfato de etilo, bajo la acción de la fosfatasa ósea, según King y Armstrong (3).

Los ésteres fosfóricos de los colorantes hidroxiazoicos como el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico (7), ofrecen, conforme se habrá observado, nuevas posibilidades a la investigación, no sólo por ser rápidamente hidrolizables bajo la acción de las fosfatasas a la simple temperatura ambiente, sino por los cambios de viraje del color que ocurren simultáneamente y que en el caso estudiado en este trabajo nos han permitido seguir comparativamente la marcha de los procesos hidrolíticos correspondientes, desde su iniciación hasta el cese de los mismos. Y ello tiene particular interés en nuestro concepto aplicado al D.D.T. y al 666, por su posible relación con el mecanismo de la acción tóxica de estos productos. Pero un conocimiento más profundo de estas cuestiones requiere mayor número de datos experimentales; considerando, sin embargo, suficientemente demostrativos nuestros resultados, con los que hemos iniciado la aplicación como sustrato de los ésteres fosfóricos de colorantes hidroxiazoicos y el estudio de la acción ejercida sobre los procesos fosfatásicos por sustancias como el D.D.T. y el 666, insolubles en el agua; pero aptas para actuar en dichos procesos convenientemente emulsionadas, o sea hallándose de modo similar al de los medios biológicos del organismo.

Resumen

Se estudia cualitativamente la acción ejercida por el D.D.T. y el 666 sobre la fosfatasa alcalina de intestino, empleados en forma de fina emulsión oleosa, mediante el bórax como agente emulsionante; logrando observar la marcha de los procesos hidrolíticos, desde su iniciación hasta cese de los mismos, utilizando como sustrato el *meta*-toluil-azo-fenilfosfato sódico, hidrolizable rápidamente a la simple temperatura ambiente, a diferencia del fenolftaleinfosfato sódico, que sólo permite apreciar la fase final de dichos procesos.

Tanto el 666 como el D.D.T. inhiben la acción de la fosfatasa alcalina de intestino, mostrándose más enérgico el primero que el segundo en las condiciones operatorias descritas por el autor.

Summary

The qualitative study of the action of D.D.T. and 666 on alkaline phosphatase of intestine is accomplished, utilizing them in the form of a fine oily emulsion by means of borax as emulsifying agent. The evolution of the corresponding hydrolytical processes is followed utilizing the sodium *meta*-tolil-azo-phenyl phosphate as substrate, which is rapidly split at the ordinary room temperature. This is not the case with sodium phenolphthalein phosphate which only permits

the appreciation of the final phase of this above mentioned processes.

Both, 666 and D.D.T., show an inhibitory action on alkaline phosphatase of intestine, greater with 666 than with D.D.T., at least in the experimental conditions which have been described in this paper.

Bibliografía

- (1) FOLLEY, S. J. y KAY, H. D., *Biochem. J.*, 29, 1837 (1935).
- (2) KAY, H. D., *Biochem. J.*, 20, 791 (1926); MARTLAND, M., HAUSMAN, F. y ROBINSON, R., *id. id.*, 18, 1152 (1924).
- (3) KING, E. J. y ARMSTRONG, A. R., *Canad. Med. Assoc. J.*, 31, 376 (1934).
- (4) KING, E. J., «Microanálisis bioquímicos en medicina», versión española, pág. 75 (Editorial Científico Médica, Barcelona 1948).
- (5) MONCHE, J., *Chimie et Industrie*, 62 (4 bis), 73 (1949).
- (6) MONCHE, J. y VIDAL-SIVILLA, S., *R. esp. Fisiol.*, en prensa.
- (7) MONCHE, J., «Substratos bicromógenos de hidrólisis rápida para fosfatasa»; trabajo pendiente de publicación.
- (8) VIDAL-SIVILLA, S. y LARRALDE, J., *R. esp. Fisiol.*, 5, 299-303 (1949).