



TESIS DOCTORAL

Nuevas aportaciones sobre modelos de fosfatasa : diálisis de la fosfatasa renal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ángel Martín Municio

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
5326700731

TJ
577.1
MAR

NUEVAS APORTACIONES SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

DIALISIS DE LA FOSFATASA RENAL



b25268478
i37880093

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro33498.....

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Química Orgánica del Instituto "Alonso Barba", bajo la dirección del Profesor M. Lora Tamayo, a quien expreso mi agradecimiento más profundo.

Asimismo, mi reconocimiento a la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la ayuda económica que me ha prestado durante la realización del mismo.

Angel M. Muñoz

NUEVAS APORTACIONES SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

DIALISIS DE LA FOSFATASA RENAL

El estudio presente fué iniciado como una continuación de los que venían realizándose en este Laboratorio sobre Modelos de Fosfatasa y en el aspecto de probar la influencia que sobre los hasta aquí reconocidos podían ejercer diversas sustancias.

El criterio en la elección de éstos habrá de estar en escoger precisamente aquellos que sobre la fosfatasa misma habían probado en mayor o menor grado su actividad. Así destacaban inmediatamente dos posibilidades de estudio: acción de iones metálicos y acción de aminoácidos, diferenciando aquí la individual de éstos y la de los mismos con los iones del primer grupo de experiencias.

La orientación que en cada uno de los casos se ha seguido va reflejada en la parte teórica correspondiente; pero - sin ruptura de la línea recta del trabajo, hubo que intercalar en él una serie de experiencias sobre la fosfatasa renal, por haber sido hechas hasta aquí solamente sobre la de origen óseo, y ser de interés conocer su comportamiento precisamente con las mismas sustancias que habíamos de emplear después junto a los modelos.

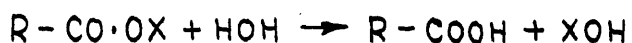
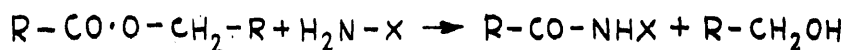
La imprecisión de los resultados y la crítica comparada de lo conseguido hasta aquí en la caracterización de efervescimentos (Dehidrasas, carboxilasas, etc.), respecto de las investigaciones sobre Modelos, nos aconsejan en este punto de la labor, dirigir nuestra atención preferente hacia el posible análisis del propio fermento (Diálisis de la fosfatasa), como medio mejor de ir después, sin empirismos, a la creación de modelos que puedan adaptarse mejor a la realidad. Este objetivo se empieza a cumplir en la tercera parte de la Tesis, cuya división en los tres apartados siguientes queda justificada en lo que precede:

- 1.- Acción de iones metálicos sobre modelos de fosfatasa.
- 2.- Acción de aminoácidos, sales y con iones metálicos, sobre modelos de fosfatasa.
- 3.- Diálisis de la fosfatasa renal.

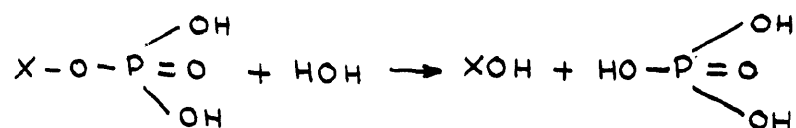
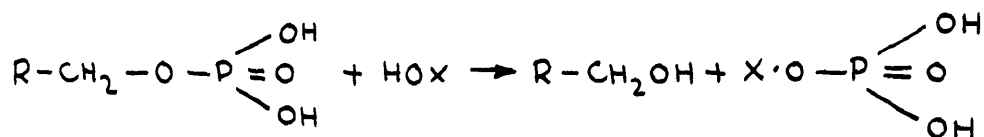
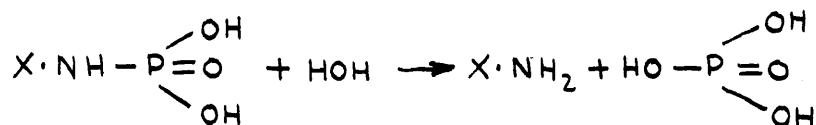
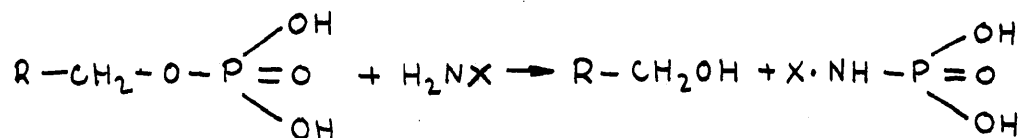
1.- ACCION DE IONES METALICOS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

- PARTE TEORICA -

En la obtención de modelos de esterasa de los que las fosfatasas son un caso particular, había de considerarse - junto al grupo alcohólico el grupo amina, que intervendrían como catalizadores en la hidrólisis de un éster segun el esquema siguiente:



Y tratándose de esteres fosfóricos en el caso de catalizadores con función alcohólica y amínica:



La elección de los grupos $-OH$ y $-NH_2$ como agrupamientos inicialmente activos se justifica plenamente en los trabajos de Lera y Segovia (1) y Lera y Tallada (2).

Coinciden estas predicciones teóricas con resultados obtenidos en experiencias de inhibición en fosfatasa de diversos orígenes (intestino, hueso, riñón etc.).

Delers y King (3) asignan a la enzima un carácter de base débil, amina aromática o aminoácido, y Gould (4) encuentra inactivaciones por cetonas, C_6H_5NCO , HO_2H y $HCHO$, lo que indica la necesidad de un grupo amino, posiblemente de lisina, y aun la existencia de $-OH$ fenólico libre. Posteriormente Baccari y Auricchio (5), (6), estudian también la importancia de los grupos $-NH_2$ libres en la acción de la fosfatasa ácida; tratando el enzima con HO_2H , CH_2O y C_6H_5NCO y dializando posteriormente comprueban que aun en la escala alcalina la fosfatasa se inhibe por la ausencia de $-NH_2$ libres.

Reche, N. van Theai y Roger (7) describen la inactiva-

(1).- Anal.de Fis.y Quim. 39, 382, 1943.

(2).- Anal.de Fis.y Quim. 41, 818, 1945.

(3).- Bioch.J. 37, 547, 1934.

(4).- J.Biol.Chem. 156, 365, 1944.

(5).- Bol.Soc.ital.Biol.sper.22.559, 1946.

(6).- Bol.Soc.ital.Biol.sper.22, 49, 1946.

(7).- Biochim.Biophys. Acta 1, 61, 1947.

ción de fosfatasa alcalina de intestinos a pH 8,8 con fluoruros, fosfatos y pirofosfatos, sin que subsiguientemente sea reactivada con alanina e hidróxido de magnesio, pero si la enzima es primeramente incubada con alanina no es inactivada con el tratamiento por cualquiera de estas sales siendo de presumir que la alanina se combina con el enzima de tal manera que bloquea los grupos sobre los que actúan estas sales.

Los grupos -SH parecen tener gran influencia en muchas fosfatasas, en especial hexosafosfatasas y pirofosfatasas (1), ya que se inhiben por reactivos del grupo sulfhidrilo y por ácido ascórbico.

Sin embargo, es de hacer constar que frecuentemente un mismo efector se comporta de manera diferente según la variedad de fosfatasa (2); así el formaldehído ejerce su máxima influencia inhibitoria en la fosfatasa eritrocítica (3) - que por el contrario no se altera en presencia de tartrato (4). Es de destacar asimismo que una misma sustancia actúa sobre idéntica fosfatasa puede ejercer acción activadora e inhibitoria dependiendo de las condiciones experimentales de concentración, naturaleza del sustrato, tiempo de hi -

(1).- K. Walsh y G. Walsh, Nature 161, 976, 1948.

(2).- V.M. Humel, Ant. Rec. 96, 423, 1946.

(3).- Abul-Fadi y King, J. Clin. Path. 1, 80, 1948.

(4).- Abul-Fadi y King, Biochem. J. 42, 28, 1948.

drolicis, etc.

Ya Langenbek (1) utilizó cuerpos distintos con grupos -OH en la caracterización de modelos de esterases sobre el tirato de metilo. Empleando los mismos modelos y operando sobre glicerofosfato sódico se encuentran los valores más altos en el naftoil-carbinoil con un 6,6 % de fósforo hidrolizado (2).

Respecto de los grupos -NH₂, Lora y Tallada son los primeros en estudiar su función como grupo activo de modelos de fosfatasa ensayando el comportamiento de aminas grasas, y aromáticas y después activaciones por los grupos CO y COCH₃, es decir, aminocetonas y aminocidos, encontrando una acción catalítica débil sobre la hidrolisis de los ésteres fosfóricos en la *w*-aminocetofenona y los ácidos *o*- y *p*-aminobenzóicos.

Con el mismo criterio comprobamos aquí, además, débiles efectos en la acción del ácido nicotínico y de la adenina, compuesto este último en el que se dan juntamente en un núcleo de piridina (amina terciaria) grupos oximetilílicos y fenólicos.

(1).- E. 67, 387, 1204, 1934; 69, 396, 1945.

(2).- Lora y Panque, Anal. Fis. y Quim. 41, 396, 1945.

Un más amplio desarrollo del trabajo ha de llevarnos al ensayo de nuevos compuestos, en los que estos grupos - considerados como activos, figuren en estructuras moleculares más complejas que puedan reforzar su acción. Hemos de estudiar el incremento de la actividad de los grupos inicialmente activos por adecuados grupos activantes que han de ser objeto en cada caso de una investigación sistemática; pero en este caso de las fosfatasa hay que hacer intervenir como coadyuvantes especiales de los modelos orgánicos, determinados elementos metálicos que han demostrado desempeñar en aquellas un importante papel.

La activación por magnesio de la fosfomonoesterasa alcalina de diversos órganos fué establecida por Erdmann (1) y Jenner y Kay (2) y comprobado después por numerosos experimentadores, incluso nosotros mismos en los preparados de fosfatasa renal obtenidos según la técnica de Albers (3).

Otros varios iones metálicos Na, Zn, Ca, Fe, etc. y en algunos casos también el magnesio han demostrado ejercer acciones variables sobre la actividad de la fosfatasa en resultados francamente contradictorios según la naturaleza del preparado y el grado de pureza en él alcanzado.

(1).- Z. physiol. Ch., 172, 182, 1927.

(2).- J. Biol. Chem. 93, 733, 1931.

(3).- Hoppe-Seyl. Z. 232, 165, 1935.

Rossi (1) encuentra activaciones de fosfatasa ósea - por iones magnesio aún a pequeñas concentraciones (0,002%) sobre el glicerofosfato sódico; el calcio a igual concentración ejerce una pequeña pero definida acción inhibidora; observándose también por Cartier y Simonart (2) la activación "in vivo" por el magnesio de la fosfatasa alcalina del hueso.

Kolnberg (3) demuestra operando con fosfatasa intestinal que la velocidad de hidrólisis sobre el glicerofosfato no es afectada por el magnesio.

Gedrangole y Regne (4) hacen experiencias de activación por magnesio de fosfatasas alcalinas en los órganos y en los preparados de enzima definiendo la zona de concentración del magnesio en la cual ejerce su acción.

K. V. Giri (5) en ensayos con fosfatasa de riñón, hígado y cerebro concluye que el tiempo de extracción y edad de los extractos afecta a la activación por el magnesio, atribuyendo estos efectos a la variación en inhibidores e impurezas en el extracto más que a cambios en la fosfatasa misma.

(1).- Bull. Soc. ital. Biol. 8, 1714, 1933.

(2).- Compt. Rend. Soc. Biol. 140, 303, 1946.

(3).- Biochem. Z. 279, 154, 1935.

(4).- Arch. Sci. Biol., 23, 504, 1937.

(5).- Z. Physiol. Chem. 254, 117, 1938.

Roche y Van Theai (1) utilizando extractos de mucosa intestinal, encuentran una fuerte activación por magnesio, manganeso y calcio y una inhibición parcial por los iones Fe y Zn, tales como en presencia de dichos Mg, Mn, o Ca; los mismos autores (2) definen el Zn como activador de la fosfatasa alcalina del suero humano normal.

Aún más que la fosfatasa alcalina, es activada por el magnesio la fosfatasa ácida de las bacterias del grupo tifo-paratífico según M. Paget y Vittu (3).

Según Lundquist (4), la fosfatasa ácida prostática es inhibida por el cinc.

Naganna y Narayana (5) afirman que la pirofosfatasa de eritrocitos es activada de 60 a 100 veces por el magnesio a concentraciones 0,02-0,05 M siendo a su vez inhibida por las sales de cobre, plata, mercurio y cinc a concentración 0,0002 M, necesitando ésta ser aumentada en el caso de hierro, cobalto, manganeso, calcio y bario. Asimismo lo es también la pirofosfatasa del hígado según Greenstein, Carter y Leuthardt (6).

(1).- Compt. Rend. Soc. Biol., 138, 49, 1944.

(2).- Compt. Rend. Soc. Biol., 140, 632, 1946.

(3).- Compt. Rend. Acad. Sci. 224, 864, 1946.

(4).- Acta. Physiol. Scand. 13, 322, 1947.

(5).- J. Biol. Chem. 174, 501, 1948.

(6).- J. Natl. Cancer Inst. 7, 47, 1946.

Aparte de los resultados de este Laboratorio trabajan do con la fosfatasa ósea, nosotros en la ocasión presente, trabajando con fosfatasa renal sobre un sustrato de glicerofosfato cálcico, ensayamos este efecto, encontrando una activación por el magnesio que puede anularse e incluso quedar transformada en inhibición al aumentar la concentración de éste. Además de esta acción del magnesio, hemos estudiado la influencia sobre la fosfatasa renal de los iones metálicos Zn, Ni, Ca, Al, Na, Fe, y Mn $N/200$ a pH neutro y además magnesio, cinc y níquel a pH ácido y óptimo alcalino, poniéndose de manifiesto una desactivación marcada ocasionada por la presencia de los iones Zn, Ni y Al; el resto de los metales apenas ejerce variación notable; la desactivación anotada ocurre en toda la escala de pH.

Simon, Fotts y Gerard estudian el efecto del cadmio (1) sobre la fosfatasa, que es inhibida a concentraciones de Cd de 10^{-3} M.

El mercurio, según Montalenti y Nicola (2) inhibe energicamente la fosfatasa alcalina del citoplasma y del núcleo.

Roche (3) resume experiencias propias y de otros in-

(1).- Arch. Biochem. 12, 383, 1947.

(2).- Experientia, 4, 314, 1948.

(3).- Helv. Chim. Ac. 29, 1253, 1946.

vestigadores, en las que se ensaya la acción de sales metálicas en presencia de alanina con o sin incubación. La fosfatasa alcalina inactivada es reactivada por incubación con alanina 0,01 M durante cuatro horas a 37° a pH 8,8 y con varios cationes bivalentes Ca 1,1. 10⁻² M; Fe 1,1. 10⁻⁷ M; Mn 1,1. 10⁻³ M; Zn 1,1. 10⁻⁷ M y Mg 1,1. 10⁻² M. Han hecho estudios sobre una supuesta fosfoesterasa de riñón cristalizada (1) que más tarde algunos de los propios autores han identificado como fosfato magnésico (2).

Gleets (3) define la fosfatasa alcalina, como formada por dos grupos, G₁ y G₂, capaces de combinación con dos iones metálicos, M₁ y M₂, en unión G₁-M₁ fácilmente dissociable; y G₂-M₂ de mayor estabilidad. Así con Zn como M₂, se obtienen fosfatasas activas, interviniendo calcio, magnesio, manganeso, cobalto y níquel como M₁; así como con calcio, magnesio o cobalto como M₁ y cobalto o mercurio como M₂.

Por encima de discrepancias, dependientes de condiciones diversas, convergen todos los resultados experimentales de esta dirección de trabajo en la adscripción a los metales de un papel esencial en la constitución de las fos-

(1).- N. Van Theai, Roche y Sartori, C. r. S. Biol. 138, 478, 1944.

(2).- Abul-*Padl*, King, Roche y Van Theai, Biochem. J. 44, 428, 1949.

(3).- Bioch. Z. 310, 42, 1941.

fosfatasas, y ello permite, en principio, considerarla como una enzima de metal dissociable en la que éste puede formar parte del complejo orgánico que es portador del grupo activo.

De todo ello se infiere el interés de ensayar los compuestos caracterizados como modelos orgánicos de fosfatasa en presencia de iones metálicos, a fin de obtener conclusiones sobre el grado de activación que éstos pueden ejercer en su actividad catalítica.

Sin duda un buen criterio en la elección de los iones metálicos que hayan de ensayarse como coactivadores de los modelos, habrá de ser suministrado por el conocimiento de los que el análisis identifique en los distintos preparados de fosfatasa.

Por ello, hemos realizado el análisis espectroscópico de las cenizas de fosfatasa ósea preparada según Lora y Rodríguez blanco (1) y de las de fosfatasa renal según Albers (2).

Del estudio comparado de los espectrogramas obtenidos se deduce la existencia en la fosfatasa ósea de CALCIO co-

(1).- Anal. Fis. y Quim., 34, 376, 1936.

(2).- Hoppe-Seyl. Z., 232, 165, 1935.

no elemento más abundante y después de él, en orden decreciente CINC, MAGNESIO, NIQUEL y HIERRO; en mucha menor proporción sodio y rayas muy débiles de silicio, boro y estroncio. Por lo que se refiere a la fosfatasa renal se demuestra también la existencia de CALCIO, MAGNESIO, CINC, NIQUEL, HIERRO, como asimismo potasio.

Se ha ensayado la actividad de algunos de estos iones y otros no reseñados en el espectro sobre los distintos modelos de acción ya comprobada. El calcio no ejerce un efecto sensible, pero los demás elementos más destacados del espectrograma Mg, Zn, Ni y el Al, que no figura en aquel, activan muy especialmente el benzoin-carbinol y la *w*-aminoacetofenona. Los resultados son más notables cuando se procede a 40° durante 8 horas. Cinc y níquel triplican la acción de la *w*-aminoacetofenona y el magnesio la duplica. Igual efecto produce éste sobre el benzoin-carbinol y Zn, Ni y Al refuerzan su actividad en un 60%. Parece ser sensible la acción del ión magnesio sobre el ácido nicotínico y la adernina; a 40° ambos modelos no liberan fósforo del sustrato, pero en presencia de aquel la cifra promedio para uno y otro es de 4 mgrs. de P por 100.

Durante las experiencias realizadas, el curso de ellas y la determinación analítica del fósforo liberado, se han visto interferidas por los modelos mismos e por reacciones secundarias debidas a la presencia de los iones metálicos.

El benzoil-carbinol reduce por sí mismo el complejo - fosfomolibdico lo que obliga a modificar la técnica colorimétrica de determinación del fósforo liberado.

La *w*-aminoacetofenona, por su parte, en las condiciones de los ensayos, origina unos productos coloreados, que pueden separarse por éter, de cuya disolución se cristaliza una difenil-piracina de punto de fusión 196°.

El ácido orto-amino-benzoico precipita sales metálicas que han sido caracterizadas y algunas de ellas preparadas por primera vez. Así ocurre con las de cinc, níquel y cobalto.

Los modelos piridínicos (sobre todo el ácido nicotínico y la vitamina B₆) dan por arrastre unos precipitados muy luminosos, en los que intervienen el fósforo liberado y el reactivo molibdico, que pueden redisolverse sin daño para la valoración.

Teniendo presente además el papel que en la estructura y el mecanismo de los fermentos ejerce el constituyente proteico, ensayamos la variación que en la actividad de los modelos ocasiona la presencia de una proteína no específica, completando las experiencias anteriores con la utilización de la separada de la fosfatasa por diálisis. En el primer caso, se obtienen globulinas de suero de vaca y sobre el sustrato de glicerofosfato sódico y en condiciones experimentales que no ocasionen la desnaturalización de la

proteína se deja actuar en el conjunto modelo-globulina y -
modelo-globulina-ión metálico. La adición de globulinas a -
los modelos, con o sin iones añadidos, no conduce a ningun-
na consecuencia de interés. Tampoco la adición del produc-
to protéico de la diálisis de la propia fosfatasa hace lla-
gar a resultados de especial activación.

"o"o"o"o"o"o"o"

PARTE EXPERIMENTAL

OBTENCION DE FOSFATASA OSEA

En la obtención de la fosfatasa ósea se utilizan los huesos largos de conejos jóvenes, de dos a tres meses, previamente privados del tejido conjuntivo. Estos huesos previamente lavados repetidas veces con agua destilada y reducidos a trozos pequeñas se extraen con una mezcla de acetato de etile, tolueno y alcohol al treinta por ciento, todos los cuales han sido purificados y rectificadas cuidadosamente (1). Por cada N gramos de huesos se utilizan N cc. de alcohol y $N/10$ de una mezcla en partes iguales de acetato de etile y tolueno; el conjunto se agita mecánicamente durante la extracción de cinco a seis horas. Una separación gruesa de la parte sólida y posterior centrifugación nos suministra un líquido amarillento del que se precipita el fermento llevando la concentración alcohólica del treinta al sesenta y cinco por ciento; el conjunto se agita energicamente unos minutos y la fosfatasa precipitada se separa

(1).- Lora y R. Blanco. Anal. Fis. y Quim. 34, 376, 1936.

per centrifugación lavándose varias veces, primero con alcohol absoluto y luego con éter anhidro, conservándose en desecador de vacío. La fosfatasa ósea es un sólido blanco, fácilmente dispersable en agua.

INCINERACION Y ANALISIS ESPECTRAL DE LA FOSFATASA ÓSEA.

A). INCINERACION.- La fosfatasa ósea se incinera en un crisol de platino obteniéndose un polvo de aspecto algo rojizo. De 0,1315 grs. de fermento se obtienen 0,0098 grs. de cenizas.

Se preparan cuatro muestras distintas de cenizas obtenidas de fosfatasa ósea precedente de diferentes extracciones.

B). ANALISIS ESPECTRAL.-

Flaca nº 1

Elec. base	Faldro	Contenido	Amp.	V	Exp.	Observaciones
Fe	-	-	-	-	25 s.	Orientación
Cu	1½	Cenizas nº 1	3,75	32,5	3 m.	Análisis
Cu	-	-	-	-	-	Orientación

Placa nº 2

Elec. base	Taldre	Contenido	Amp.	V.	Exp.	Observaciones
Fe	-	-	-	-	25 s.	Orientacion
Cu	1½	Cenizas nº 2	3,75	32,5	3 m.	Análisis
Cu	1½	Cenizas nº 3	-	-	-	Id.
Cu	1½	Cenizas nº 4	-	-	-	Id.
Cu	-	-	-	-	-	Orientación
Cu	2	SO ₄ Ni (esp. pura)	-	-	2 m.	Id.
Cu	2	SO ₄ Co (e. p.)	-	-	2 m.	Id.
Cu	2	OZn (e. p.)	-	-	2 m.	Id.
Cu	2	Cl ₂ Hg (e. p.)	-	-	2 m.	Id.
Cu	2	SO ₄ Mn (e. p.)	-	-	2 m.	Id.
Cu	-	-	-	-	3 m.	Id.

Se han fotografiado en la misma placa los espectros de algunos metales para facilitar el estudio, del que se deduce una completa identidad en las cuatro muestras de cenizas de fosfata.

Queda claramente demostrada en ellas la existencia de los metales: Calcio, Magnesio, Cinc, Hierro y Niquel, y en menor proporción Sodio, Estroncio, Silicio y Boro.

OBTENCION DE LA FOSFATASA RENAL (1).-

La papilla de riñones, previamente privados de todo el tejido conjuntivo, se extrae con una mezcla de alcohol al 50%, acetato de etilo y tolueno, todos los cuales han sido cuidadosamente purificados y rectificadas. Por cada N gramos de Papilla de riñones se utilizan N cc. de alcohol y N/10 cc. de una mezcla en partes iguales de acetato de etilo y tolueno; este conjunto se agita mecánicamente durante cuatro a cinco días al cabo de los cuales se hace primeramente una separación gruesa de la parte sólida mediante un Buchner adecuado, filtrándose a continuación la suspensión obtenida. Cuando se emplean cantidades relativamente grandes en la extracción la filtración ha de ayudarse accidentalmente con un pequeño vaso y separando la torta sólida que progresivamente se forma.

El líquido obtenido con un color amarillento, más o menos oscuro según la eficacia de la extracción, contiene la fosfatasa del que se separa por precipitación con alcohol, bien absoluto o del 95%, llevando la concentración alcohólica del 50 al 65%. En el cálculo de la cantidad de alcohol a añadir hay que tener en cuenta la presencia de los otros disolventes, la concentración del alcohol que se utiliza y las pérdidas que del conjunto tienen lugar ya sea -

(1).- Hoppe-Seyl. Z. 232, 165, 1935.

por evaporación inevitable e por su retención por el sólido.

Una vez llevado el líquido filtrado a dicha concentración del 65%, se agita durante unos minutos enérgicamente, y se coloca el conjunto en probetas altas para favorecer el depósito de la fosfatasa y su posterior separación por decantación; el decantado se centrifuga y la fosfatasa obtenida se lava repetidas veces con alcohol y éter anhidro. Se conserva en desecador de vacío.

El aspecto de la fosfatasa renal es exactamente igual al de la fosfatasa ósea y el rendimiento aproximadamente de un gramo por cada kilógramo de papilla de riñones.

La fosfatasa así obtenida se dispersa bien en agua y pueden prepararse con ella suspensiones homogéneas para los ensayos ulteriores.

INCINERACION Y ANALISIS ESPECTRAL DE LA FOSFATASA RENAL.-

a.- Incineración.

La fosfatasa se incinera en crisol de platino obta - niéndose un polvo de aspecto débilmente grisáceo. De 0,2440 gra. de enzima se obtienen 0,0109 gra. de cenizas.

Se preparan dos muestras distintas de cenizas obtenidas de fosfatasa renal precedente de extracciones diferentes.

b.- Análisis espectral.

El análisis espectral se realiza en la película obtenida con arreglo al dispositivo:

Elec. base	Filtro	Contenido	Amp.	V.	Exp.	Observas.
Fe	-	--	-	-	25 s.	Orient.
Cu	1½	Cenizas I	3,75	32,5	3 m.	Análisis
-	-	Id. II	-	-	-	Id.
Cu	-	--	-	-	-	Orient.
-	2	SO ₄ Zn (e.p.) (Zn)	-	-	2 m.	Id.
-	-	SO ₄ Ni (e.p.) (Ni)	-	-	-	Id.
-	-	SO ₄ Mg (e.p.) (Mg)	-	-	-	Id.
-	-	CO ₃ Ca (e.p.) (Ca)	-	-	-	Id.
-	-	Al ₂ O ₃ (e.p.) (Al)	-	-	-	Id.

En la misma película se han fotografiado los espectros de algunos metales para favorecer el estudio del que se deduce una completa identidad en las dos muestras de cenizas de fosfatasa.

Queda demostrada la existencia en ellas de los metales MAGNESIO, CINC, NIQUEL, CALCIO, HIERRO, siendo de destacar una notable riqueza en magnesio, así como débiles lí

ness de sodio y potasio.

ACCION DE LOS IONES METALICOS SOBRE LOS MODELOS DE FOSFATASA

A).- PREPARACION DE ALGUNOS MODELOS.

a). ω -aminoacetofenona: A partir de la acetofenona por bromación (1) y calificación con ftalimida potásica de la bromoacetofenona (2) resultando la ω -aminoacetofenona - del tratamiento con ácido clorhídrico de la fenacilftalimida.

b). Benzoin-carbinol. Se prepara a partir de la ω -bromoacetofenona (3) según la nota operativa de G. Ramón (4).

c). Acido p-aminobenzoico. Se ha preparado por hidrólisis de la anestésina.

B).- PREPARACION DE LA SOLUCION TAMPON.

Para mantener constante el pH conveniente a cada uno

(1).- B₁, VII, 283.

(2).- Gabriel.B. 41, 1132, 1908

(3).- B. 24, 2680, 1891; 39, 2294.

(4).- G. Ramón. Anal. Fis. y Quím. 5, 587, 1948.

de los ensayos se utiliza solución tampón de acetato-veronal, preparada mezclando 5 cc. de solución de veronal sódico, 2 cc. de cloruro sódico al 8,5% y 20 cc. de una mezcla de ácido clorhídrico 0,1 N y agua destilada variable según el pH de que se trate; la solución de veronal se prepara con 9,714 grs. de acetato sódico, 14,714 grs. de veronal sódico y agua destilada libre de CO₂ hasta 500 centímetros cúbicos.

G). ENSAYOS DE HIDROLISIS.

a). Modelos empleados. Benzoin-carbinol, ω-aminacetofenona, ácido p-aminobenzoico, ácido o-aminobenzoico, ácido nicotínico, nicotamida, vitamina B₆.

b). Iones metálicos ensayados. Cinc, níquel, magnesio, calcio, sodio y aluminio en solución N/20.

c). Técnica operatoria. Se emplea como sustrato una disolución N/20 de glicerofosfato sódico tamponada con acetato-veronal; sobre este sustrato hacemos actuar los modelos anteriores a la vez que consideramos la influencia metálica sobre ellos.

D). MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LOS MODELOS.

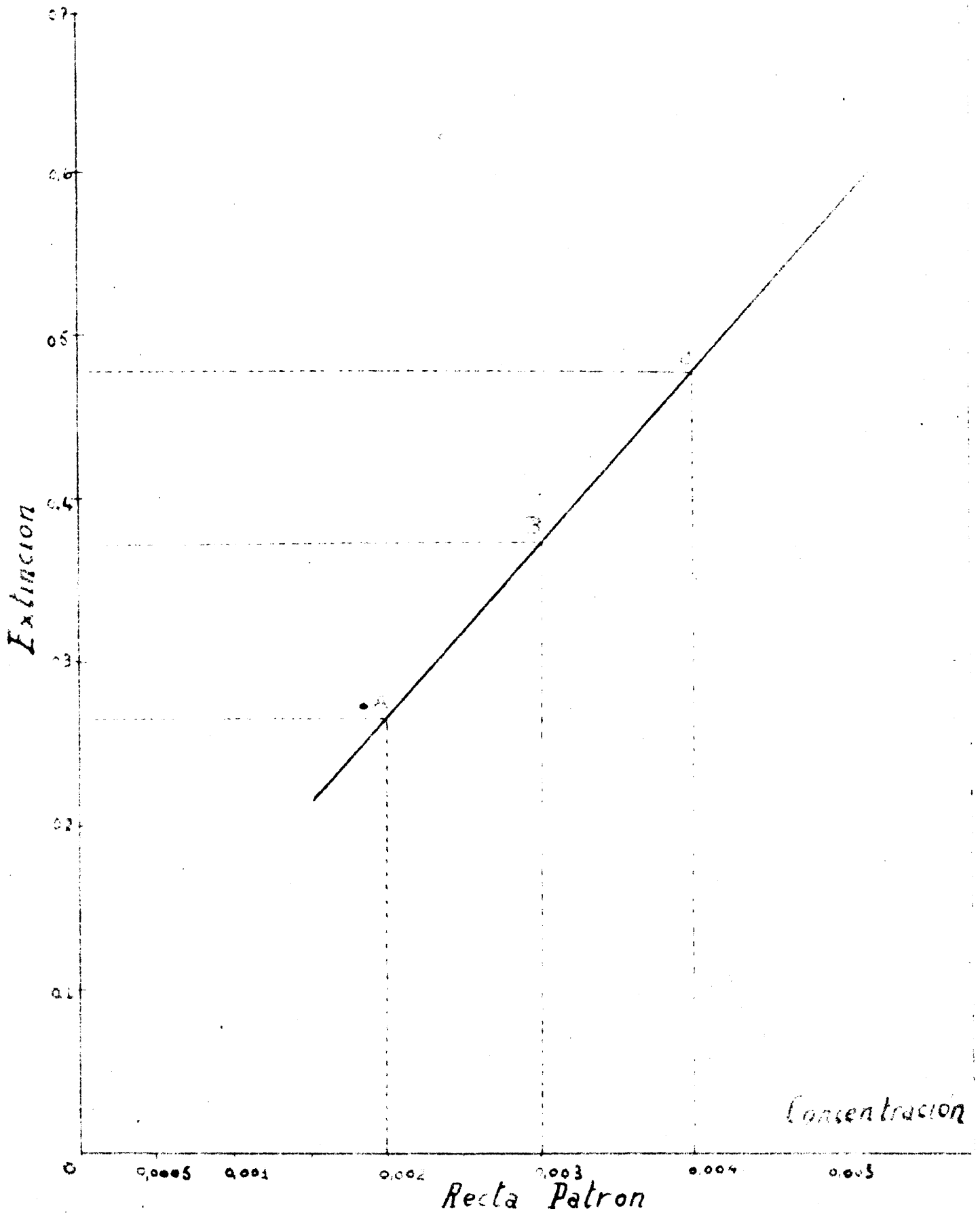
En el estudio cuantitativo de la actividad fosfatási-

ca de los modelos, utilizamos para la determinación de la cantidad de fósforo inorgánico liberado la técnica colorimétrica de Brigg (1) fundada en la reducción del fosfomolibdato amónico a azul de molibdeno por la acción de la mezcla hidroquinona-sulfito sódico.

Una vez transcurrido el tiempo durante el cual ha actuado el modelo sobre el substrate y suspendida la acción por un descenso rápido de temperatura, las operaciones que siguen a la hidrólisis van encaminadas fundamentalmente a obtener una disolución de fosfato de concentración adecuada para la mayor exactitud del procedimiento utilizado en la valoración.

La línea extinción-concentración (gráfico 1) obtenida con soluciones "standard" de fosfato, valoradas gravimétricamente en forma de pirofosfato amónico-magnésico, única - mente es recta entre las extinciones aproximadas de 0,2 y 0,6; y por tanto, las transparencias medidas por el colorímetro correspondientes a estas extinciones han de caer así mismo dentro de una determinada zona, lo cual se consigue lógicamente mediante una dilución adecuada del líquido que contiene el fosfato a valorar. Por tanto no podemos exponer de una manera general las manipulaciones para todas las investigaciones de este tipo sino que en cada caso por

(1).- J. Biol. Chem. 59, 255, 1924.



Nota EXTINCION . CONCENTRACION

(Gráfico 1)



La transparencia leída en el colorímetro, previamente transformada (1) en extinciones, nos da por medio de la recta Extinción-Concentración los mgrs. de P existentes en 1 cc. de disolución valorada.

E). DISPOSITIVO GENERAL DE HIDROLISIS.

El dispositivo general de hidrólisis es el siguiente:

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Glicerofosfato-tampón de acetato-veronal ..	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua destilada	2 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Solución matflora M/20		1 cc.Zn	1 cc.HI	1 cc.Mg	1 cc.Co	1 cc.Ka	1 cc.AI

(1).--A.D.Marenski Fotometría y su aplicación al análisis biológico. Pags. 45-46

Simultáneamente se disponen los siguientes testigos sin modelo y sin sustrato respectivamente:

Testigos con sustrato de glicerofosfato-tampón sin modelo.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Glicerofosfato-tampón acetato-veronal	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
Agua	2 c.c.	2 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Solución metálica M/20		1 cc.Zn	1 cc.HI	1 cc.Mg	1 cc.Co	1 cc.No	1 cc.AL

Testigos sin sustrato con modelos.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Agua destilada	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
Modelo	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua destilada	2 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Solución metálica		1 cc.Zn	1 cc.HI	1 cc.Mg	1 cc.Co	1 cc.No	1 cc.AL

No obstante, cada modelo representa un caso particular y un problema a resolver siempre acentuando en su acción -- conjunta con los iones metálicos.

F). CONDICIONES EXPERIMENTALES.

El conjunto de experiencias que tienen lugar con los modelos en unión de iones metálicos se realizan en solución perfectamente tamporada, cuya constancia se ha observado -- por lecturas electrométricas. Se procede calentando en termostato durante ocho horas a 40° o bien a 80° durante cuatro horas. En las tablas I y II se expresan los resultados obtenidos en estas condiciones y a pH 6,7.

OBSERVACIONES.

1º). Después de la hidrólisis con el bencil-carbinoil se encuentra que aun los testigos sin sustrato dan coloración azul con los reactivos, lo que obliga a separarlos de la disolución por repetidas extracciones con éter antes de llevar el conjunto a la dilución apropiada.

2º). La W-aminoacetofenona experimenta durante la calificación una descomposición pronunciada incrementada por la presencia de metales sobre todo del níquel que ocasiona -- la formación de abundante precipitado y coloración jera --

T A B L A I

	H ₂ O	Zn	Ml	Mg	Ca	Fe	Al
Metales	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Benzoilcarbinol	0,00%	0,13(62)	0,13(62)	0,16(100)	0,08	0,07	0,13(62)
o-aminobenzoico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
p-aminobenzoico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
w-aminocetofe- nora	0,52	1,0(100)	1,7(226)	1,2(130)	0,48	0,40	0,54
Acido nicotínico	0%	0%	0%	3,8%	0%	0%	0%
Nicotamida	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Vitamina B ₆	0%	0%	0%	4,2%	0%	0%	0%

T A B L A I I

	H ₂ O	Zn	KI	Mg	Ca	Na	Al
Metales		0,18%	0,18%	0,21%	0,06	0	0,30%
BenzilcarbinoI ..	0,39	0,77(97)	0,58	0,70(48)	0,51	0,4	0,83
o-aminobenzoince...	3,75	3,01	3,14	3,40	3,51	3,7	
p-aminobenzoince...	3,83	1,98	2,1	2,21	3,6	3,77	1,87
w-aminacetofenona	4,44	5,3(19)	5,5(23)	5,08(14)	4,36	4,38	
ácido nicotínico §	2,2	1,68	2,2	2,36	2,2	2,15	1,67
nicotamida	0	0	0	0	0	0	0
Vitamina B ₆	1,7	1,5	1,67	2,2(29)	1,7	1,7	1,67

Los números entre paréntesis representan el % de incremento de la actividad.

intensa; el cinc da también lugar a la formación de precipitado abundante aunque no tan intensa coloración; el precipitado del magnesio es menor si bien la coloración es como en el caso del níquel.

Para valorar se elimina el color por extracción con éter. De los extractos etéres se consigue cristalizar una sustancia de punto de fusión 196°:

ANÁLISIS

N %	11,98
N % calculado para $C_{12}H_{10}ON$	12,06
(2,5-difenilpirasina p.f. 196°)	

39). El ácido orto-aminobenzóico actuando sobre la disolución tamponada de glicerofosfato sódico y en presencia de iones cinc, níquel y cobalto forman precipitados respectivamente blanco-amarillento, ligeramente verdoso y ligeramente rosado que hay que separar por filtración para proseguir la valoración del fósforo. La precipitación es cuantitativa con relación al componente metálico y los precipitados se caracterizan como las sales correspondientes del ácido orto-aminobenzóico. El grupo $-NH_2$ del ácido no participa en la formación del compuesto metálico ya que los precipitados son fácilmente diazotables.

Precipitado con Zn.

Sólido de color blanco-amarillento, insoluble en agua fría y a ebullición; soluble en ácidos diluidos incluso en acético, y fácilmente diazotable.

ANÁLISIS

N %	8,29
experimental		
N %	8,24
$(H_2N-C_6H_4-COO)_2Zn$		
Zn %	19,8
experimental		
Zn %	19,48
$(H_2N-C_6H_4-COO)_2Zn$		

Precipitado con Ni.

Sólido con ligero color verdoso, insoluble en agua, difícilmente soluble en ácido acético diluido; fácilmente diazotable.

ANÁLISIS

N %	8,48
experimental		
N %	8,51
$(H_2N-C_6H_4-COO)_2Ni$		
Ni %	17,78
experimental		
Ni %	17,8
$(H_2N-C_6H_4-COO)_2Ni$		

Precipitado con Co.

Sólido con ligero color rosado, insoluble en agua, difícilmente soluble en ácido acético diluido y fácilmente diazotable.

ANÁLISIS

N %	8,53
experimental		
N %	8,56
$(H_2N-C_5H_4-COO)_2Co$		
Co %	17,81
experimental		
Co %	17,9
$(H_2N-C_5H_4-COO)_2Co$		

4^o). En la valoración con molibdato-hidroquinona-sulfite de la acción debida a los modelos ácido nicotínico, niacetamida y vitamina B₃ aparece un precipitado voluminoso - amarillento en el preciso momento de la adición del molibdato.

Este precipitado se forma:

a). Cuando se mezclan en frío: disolución de fosfato potásico, disolución de ácido nicotínico, la amida o vitamina E. y disolución de molibdato amónico.

b). Cuando el sustrato de glicerofosfato se calienta - previamente a 80° durante cuatro horas con dichos tres me-

deles y luego se añade a la disolución el molibdato amónico.

e). Cuando mezclando previamente fosfato potásico y molibdato amónico, sin que entre ellos ocurra reacción alguna, se añade posteriormente la disolución del modelo ensayado.

d). Con solución de ácido molibdico, fosfato potásico y ácido nicotínico, nicotamida o vitamina B₆.

En cambio no se forma dicho precipitado tomando pares aislados de las soluciones fosfato-modelo-molibdato amónico; así como tampoco al mezclar soluciones de ácido molibdico, ácido fosfórico y solución de modelo.

De todo ello parece deducirse la acción conjunta del modelo y el fosfato, añadido e producido en la hidrólisis del glicerofosfato, con el molibdato amónico en la formación del precipitado.

Valoración cuantitativa del fósforo por el precipitado producido.

Como el fósforo forma parte del precipitado producido pretendemos valorar el fósforo liberado con la hidrólisis por disolución del precipitado en NaOH 0,1 N, como si se tratase de fosfomolibdato amónico, y luego el exceso de álcali valorarlo con ClH 0,01 N. Hacemos varias pruebas con

los precipitados formados valorándoles simplemente previa centrifugación y también por centrifugación y anterior lavado con agua y alcohol.

La disposición de los ensayos es:

<u>I</u>			<u>II</u>				
4 c.c. agua			4 c.c. agua				
1 cc. agua-1 cc. fosfato (0,1 mgr. P/cc.)			1 cc. agua-1 cc. fosfato (0,1 mgr. P/cc.)				
<u>III</u>		<u>III'</u>	<u>III''</u>	<u>IV</u>		<u>IV'</u>	<u>IV''</u>
4 c.c. agua			4 c.c. agua				
1 cc. agua-1 cc. fosfato (0,1 mgr. P/cc.)			1 cc. agua-1 cc. fosfato (0,1 mgr. P/cc.)				
0,2 mmol ácido nicotínico			0,2 mmol nicotamida				

A todos estos conjuntos añadimos un centímetro cúbico de solución al 5% de molibdato amónico en ácido sulfúrico 5 N. A los conjuntos I y II no les ocurre nada y en el resto se forman abundantes precipitados; III' y IV' lavamos con agua; III'' y IV'' lavamos con alcohol y los III y IV los centrifugamos solamente. Al lavar el precipitado con alcohol se disuelve en gran parte el correspondiente al ácido nicotínico; el precipitado formado en presencia de la amida no se disuelve tan fácilmente. Este hecho induce a pensar la

desigualdad de ambos precipitados y por tanto la participación en ellos del ácido o de la amida respectivamente.

Los resultados de la valoración son los siguientes:

		<u>g. g. gastados</u>	
		$\text{NaOH } 0,1\text{N}$	$\text{ClH } 0,01\text{N}$
		(f=0,822)	(f=1,069)
	III	4	1,8
Sin lavar			
	IV	5	11,4
	III'	3,6	12,7
Lavado con agua			
	IV'	2	4,5
	III'' ...	1	8
Lavado con alcohol			
	IV''	2	9,4

Cálculo del fósforo contenido en el precipitado disuelto en sosa 0,1N (f=0,822) como si se tratase de fosfonilbato amónico.

III.- 4 cc. 0,822 = 3,288 cc. $\text{NaOH } 0,1\text{N}$
 1,8 . 1,069 = 0,190 cc. $\text{ClH } 0,1\text{N}$
 3,29 - 0,19 = 3,10 cc. $\text{NaOH } 0,1\text{N}$ gastados
 3,10 . 0,1348 (Mgros. de P. correspondientes =
 = 0,41 mgros. de P. a 1 cc. de
 $\text{NaOH } 0,1\text{N}$).

Como en total pusimos en el ensayo III 0,1 mgrs. de fósforo y se da el caso de que el resultado es como si existiera cuatro veces más, el precipitado total no debe ser de la constitución de un fosfomolibdato; pudiera entrar en su formación el ácido nicotínico que consumiera en su disolución más álcali del debido con el aumento consiguiente en el imaginario porcentaje de fósforo.

IV. 3 . 0,822 = 2,466 cc. NaOH 0,1N
11,4 . 1,069 = 1,21 cc. ClH 0,1N
2,46 - 1,21 = 1,25 cc. NaOH gastados
1,25 . 0,1348 = 0,168 mgrs. de P.

Esta cantidad es también algo superior pero más aproximada a la cantidad de P. puesta (0,1 mgrs.); la nicotamida aunque formara parte del precipitado no consumiría álcali.

III' 3,6 . 0,822 = 2,96 cc. NaOH 0,1N
12,7 . 1,069 = 1,36 cc. ClH 0,1N
2,96 - 1,36 = 1,60 cc. NaOH 0,1N gastados
1,60 . 0,1348 = 0,21 mgrs. de P.

Vemos que aun después de lavado con agua el precipitado - conteniendo ácido nicotínico sigue dando un valor de fósforo doble del puesto en el ensayo correspondiente, aun -

que descendido notablemente de cuando no se lavó.

IV'. 2 . 0,822 = 1,644 cc. NaOH 0,1N
4,5 . 1,069 = 0,48 cc. ClH 0,1N
1,64 - 0,48 = 1,16 cc. NaOH 0,1N gastados
1,16 . 0,1348 = 0,15 mgrs. de P.

Es aproximadamente igual que el valor obtenido cuando el sistema en presencia de nicotamida no se lavó con agua y algo superior aún al valor de fósforo puesto en la disolución.

III''. 1 . 0,822 = 0,822 cc. NaOH 0,1N
8 . 1,069 = 0,85 cc. ClH 0,1N
0,85 - 0,85 = 0

Vemos que al lavar el precipitado, obtenido en presencia de ácido nicotínico, con alcohol se ha disuelto en él todo lo que habría posteriormente de disolverse en agua.

IV''. 2 . 0,822 = 1,644 cc. NaOH 0,1N
9,4 . 1,069 = 1,00 cc. ClH 0,1N
1,64 - 1,00 = 0,64 cc. NaOH gastados
0,64 . 0,1348 = 0,08 mgrs. de P.

Valer también aproximado, en presencia de nicotamida, aunque en este caso por defecto, a la cantidad de P puesta en la disolución.

Influencia en la composición del precipitado de la cantidad de molibdato añadida.

Al conjunto: 4 cc. agua destilada
 0,2 mmol ácido nicotínico
 1 c.c. H₂O-1 c.c. sol. fosfato (0,1 mgr.P)

repetido dos veces añadiendo 1 ó 2 c.c. respectivamente de solución de molibdato amónico al 5%. En ambos casos centrifugamos el precipitado formado, disolvemos en sesa, y valoramos el exceso de álcali con ácido clorhídrico 0,01N. Los resultados han sido:

Molibdato amónico	<u>c.c. añadidos</u>	
	N ₂ OH 0,1N	ClH 0,01N
1 c.c.	3	5,8
2 c.c.	3	5,6

Cálculos:

3	. 0,822	= 2,466 cc. NaOH	3	. 0,822	= 2,466 cc. NaOH
5,8	. 1,069	= 0,620 cc. ClH	5,6	. 1,069	= 0,598 cc. ClH
2,466	- 0,620	= 1,846 cc. NaOH	2,466	- 0,598	= 1,868 cc. NaOH
1,84	. 0,1348	= <u>0,248 mgrs. P.</u>	1,86	. 0,1348	= <u>0,250 mgrs. P.</u>

Como puede observarse, no hay influencia alguna motivada - por la cantidad de molibdato añadida.

Influencia sobre la composición del precipitado de la calcificación a 80° durante cuatro horas del sistema.

4 c.c. de glicerofosfato sódico M/20

0,2 mmol de á. nicotínico e la amida

1 c.c. agua

1 c.c. solución de fosfato (0,1 mgrs. de P).

En frío el modelo no tiene acción sobre el sustrato y el valor obtenido por el anterior método volumétrico para este sistema en frío, será únicamente debido al fosfato si bien en ambos valores de fósforo, teórico añadido y experimental del precipitado calculado en forma de fosfomolibdato amónico no coinciden bien por no corresponder dicho precipitado exactamente a la fórmula $PO_4(NH_4)_3 \cdot 12 NaO_3$, bien por intervenir en su composición cantidades variables de modelo. Si al calentar el conjunto anterior hubiese a 1

guna variación en la composición del precipitado tendría -
que verificarse:

(Valor en caliente) - (Acción del modelo sobre el -
80°, 4h.

substrato / Valor en frío del sistema

1a). Con ácido nicotínico

	<u>C.C. casados</u>	
	<u>NaOH 0,1N</u>	<u>ClH 0,01N</u>
Valor en frío del sistema	3	3,2
Valor en caliente	4	0,2
Acción independiente	3	5,7

Resultados:

	<u>mgs. de P</u>
Valor en frío	0,285
Valor en caliente	0,440
Acción del modelo	0,240

De donde se deduce que el valor en caliente viene a ser -
aproximadamente igual al valor en frío más el valor de la
acción que a 80° durante cuatro horas ejerce independien-
temente el ácido nicotínico sobre el glicerofosfato sódico.

2a). Con la amida nicotínica

	<u>c.c. gastados</u>	
	NaOH 0,1N	ClH 0,01N
Valor en frío del sistema ...	3	8,5
Valor en caliente	3	3,6
Acción del modelo	2	7,0

Resultados:

	<u>mgs. de P₂</u>
Valor en frío	0,195
Valor en caliente ..	0,280
Acción del modelo ..	0,119

También en este caso se verifica con bastante aproximación la igualdad: Valor en caliente = Valor en frío + Acción -- del modelo. De ello podemos concluir que el precipitado -- producido al investigar la acción de los modelos de nicotínico y nicotamida sobre el glicerofosfato sódico es el mismo que el obtenido en frío en los ensayos anteriores.

Contenido en nitrógeno del precipitado. - Hacemos análisis de N amoniacal del precipitado amarillo obtenido en las ex periencias anteriores:

% N amoniacal del precipitado	0,42
% N $PO_4(NH_4)_3, 12 H_2O$	2,2

La inconstancia de la composición de este precipitado deducida de los resultados analíticos no permite asignarle una estructura definida, pareciendo posiblemente un caso de arrastre del modelo por el tamaño de la molécula fosfomolibdica. No puede valorarse, por tanto, su contenido en fósforo por el método volumétrico ensayado y para obviar la dificultad que crea su aparición se ha procurado que todo el precipitado se redisuelva, mediante ensayos preliminares de su solubilidad, en la solución sulfúrica del reactivo, dando previamente al líquido que contiene el fósforo una dilución adecuada de modo que todo él pueda formar rápidamente el azul de molibdeno para su valoración colorimétrica.

Para ver la posible interferencia en la valoración motivada por la aparición de este precipitado se hacen determinaciones colorimétricas con soluciones estándar de fosfato según la siguiente disposición:

4 c.c. de agua destilada

0,2 mmol de ácido nicotínico

1 c.c. H_2O -1 c.c. sol. fosfato(0,1 mgr.P)

1 c.c. de esta disolución contiene 0,0160 mgrs. de fósforo y en la valoración colorimétrica se obtienen 0,0169 mgrs. P/cc. Luego esta valoración colorimétrica es prácticamente correcta en presencia de los modelos, aun cuando -

se llegue a formar el precipitado pero con tal que se redi-
suelva en seguida y pueda tomar parte en la reacción cele-
reada.

5^a). En el caso de acción combinada del ácido nicotí-
nico y la vitamina B₃ con el ión Mg se reproducen en la ta-
bla I unos valores obtenidos repetidas veces según el dis-
positivo principal:

4 cc. glicerofosfato-tampón N/20

0,2 mmol de modelo

1 c.c. H₂O - 1 cc. sol Mg

pero al lado de estos valores elevados se han obtenido en
estas condiciones algunas veces resultados negativos de hi-
drólisis obteniéndose los primeros cuando el correspondien-
te testigo sin modelo ni metal da un contenido inicial en
fosfato liberado. Desde luego, las experiencias han sido -
realizadas simultáneamente con el ácido nicotínico, la ni-
cetamida y la vitamina B y con el mismo substrate y la --
misma solución de sal de magnesio, en idénticas condicig -
nes experimentales y empleando en su valoración la misma -
dilución:

T r a n s p a r e n c i a s

<u>Dilución</u>	<u>Acido</u>	<u>Amida</u>	<u>Vit. B₃</u>
1 : 15	31	88	27

INFLUENCIA DE GLOBULINAS SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

A). Obtención de globulinas.

Las globulinas se obtienen a partir de suero de sangre de vaca. El suero es previamente centrifugado y luego se trata con un volumen igual de una solución saturada de sulfato amónico dejándolo estar en reposo a baja temperatura durante doce horas. El sólido precipitado se filtra a la trompa y lava con solución de sulfato amónico a media saturación.

La torta de proteínas así obtenida se disuelve en la menor cantidad posible de disolución semisaturada de sulfato amónico y se purifica finalmente por diálisis.

B). Acción independiente de globulinas y combinadas con metalas.

a). Disposición de las experiencias.

Se emplea sustrato de glicerofosfato $M/20$ -tampón, de acetato-veronal sobre el que se hace actuar la proteína -- bien sola o unida al metal correspondiente:

	I	II	III	IV	V	VI
Substrato	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Agua ...	1 cc.					
1 cc. sol. M/20		Zn	Ni	Hg	Ca	Al
1 cc. glg bulina	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.

disponiéndose además la correspondiente serie de testigos sin substrate y sin globulina y globulina-metal.

b). Las condiciones experimentales son siempre que se empleen globulinas 40% durante un periodo de ocho horas.

c). Técnica operatoria.

Para evitar la precipitación de las proteínas añadidas con los reactivos de valoración del fósforo, se separan -- previamente con solución al 20% de ácido tricloroacético, se filtra y se lleva la disolución a la dilución conveniente.

En los casos del benzil-carbinol y la α -aminoacetofenona son válidas las observaciones hechas anteriormente a este respecto.

T A B L A I I I

	H ₂ O	Zn	Mg	Kg	Ca	Al
Globulinas	0,84	0,69	0,71	0,79	0,73	0,54

g). ACCION CONJUNTA DE GLOBULINAS Y MODELOS DE FOSFATASA

a). Disposición de los ensayos.

Se emplea substrate de glicerofosfato sódico N/20 taponada en la misma disolución con acetato-veronal y sobre este conjunto substrate-tampón se hacen actuar conjuntamente los diversos modelos ensayados con globulinas con arreglo al siguiente esquema:

	I	II	III	IV
Substrate..	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
0,2 mmol de modelo	benzoin-carbinal	o-amino-benzoico	p-amino-benzoico	w-aminoacetofenona
Agua	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Globulinas.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.

	V	VI	VII
Substrate .	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
0,2 mmol de modelo	ácido nicotínico	amida nicotínica	vitamina B ₆
Agua	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
Globulinas.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.

b). Las condiciones experimentales y la técnica operativa exactamente igual que en el caso anterior.

T A B L A IV

Globulinas	0,84%	
Id. con benzoin-carbinoel	0,85%	
Id. con p-aminobenzoico	0,76%	0,56%
Id. con o-aminobenzoico	0,64%	0,61%
Id. con w-aminocetofenona .	0,38%	0,84%
Id. con ácido nicotínico ...	0,60%	0,53%
Id. con nicotamida	0,85%	0,85%
Id. con vitamina B ₆	0,76%	0,70%

La segunda columna de valores se refiere a resultados obtenidos en experiencias de incubación previa de los modelos -

con la proteina.

D). ACCIÓN DE GLOBULINAS Y METALES JUNTAMENTE CON MODELOS DE FOSFATASA.

a). Disposición de los ensayos.

Se utiliza como substrate una disolución N/20 de glicerofosfato sódico en tampon de acetate - veronal sobre la que se hace actuar conjuntamente el modelo respectivo con las globulinas y cada uno de los metales ensayados.

El dispositivo de esta serie de experiencias es el siguiente:

	I	II	III	IV
Substrate.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
Modelo ...	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Agua	1 c.c.			
Globulinas	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
1 cc. solución metal		Zn	Ni	Hg

	V	VI	VII
Substrato	4 c.c.	4 c.c.	4 c.c.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Globulinas ...	1 c.c.	1 c.c.	
Agua			2 c.c.
1 cc. solución metálica ..	Ca	Al	

Todo este conjunto se repite para cada uno de los modelos benzil-carbinol, *w*-aminoacetofenona, *o*-aminobenzóico, *p*-aminobenzóico, ácido nicotínico, nicotamida y vitamina B₆ con sus correspondientes series de testigos.

b). Las condiciones experimentales como en los casos anteriores en que se ensayan globulinas, calefacción a ochenta grados durante ocho horas en termostato. La técnica operatoria después de la calefacción como la ya descrita en el caso anterior.

c). Los resultados obtenidos se exponen en la tabla V:

T A B L A V

	Zn	Ni	Mg	Ca	Al
Globulinas	0,69 %	0,71 %	0,79 %	0,73 %	0,54 %
Id. con benzoincar- binol	0,78 %	0,76 %	0,87 %	0,80 %	0,63 %
Id. con o-amineben- zofco	0,52-0,20	0,52-0,36	0,77-0,51	0,21	0,20
Id. con p-amineben- zofco	0,20-0,00	0,20-0,00	0,64-0,50	0,48-0,28	0,19-0,12
Id. con nicotini- co	0,55-0,1	0,51	0,98	0,54	0,60
Id. con nicotamida.	0,50-0,08	0,40	0,47		
Id. con vitamina B	0,64	0,61	1,3		

Las segundas columnas de valores se refieren a resultados de experiencias con incubación de modelos con globulinas.

Copulación de modelos de fosfatasa con "proteína" de fosfa
tasa renal.

La proteína de la fosfatasa renal obtenida en la elec-
trodiálisis clorhídrica como se menciona anteriormente, se
centrifuga, se lava con agua destilada y se prepara con --
ella una suspensión acuosa lo más homogénea posible, la --
cual se utiliza en los ensayos de hidrólisis incubada pre-
viamente durante veinticuatro horas a la temperatura ordina-
ria con 0,2 m.moles de los modelos: ácido o-aminobenzoico,
ácido p-aminobenzoico, benzilcarbinol, w-aminacetofenona,
ácido nicotínico y nicotamida. Las experiencias se reali-
zan utilizando sustrato de glicerofosfato sódico M/20-tam-
pón de acetato-veronal pH 9,16 calentando a 40° durante --
ocho horas.

El dispositivo de hidrólisis es el siguiente:

	<u>I</u>	<u>II</u>
Glicerofosfato M/20- -tampón pH 9,16	4 c.c.	4 c.c.
Proteína de fosfatasa	1 c.c.	1 c.c.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol
	1 c.c. H ₂ O	1 c.c. (Mg, Zn, Ni, Ca)

Este conjunto se repite para todos y cada uno de los mode-
los de fosfatasa mencionados con anterioridad.

Asimismo se disponen los testigos que podrán de mani --

fieste la actividad que sobre el mismo sustrato ejerza la proteína aislada y la proteína influida por los metales -- aislados y en conjunto como se disponen en combinación con los modelos:

<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>		<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>	<u>VII</u>
4 c.c. subst.	4 c.c. subst.	4 c.c. subst.		4 cc. subst.	4 cc. subst.	4 cc de agua	4 cc. subst.
1 c.c. proteína	1 c.c. proteína	1 c.c. proteína		1 cc. proteína	1 cc. proteína	1 cc. proteína	
1 c.c. agua	1 cc. (Mg, Zn, Ni, Ca)	1 c.c. Mg		1 cc. Zn	1 cc. Ni	1 cc. agua	2 cc. agua

Terminada la calefacción se enfría el conjunto y se añade en todos los casos 0,5 c.c. de ácido tricloroacético y 0,5 c.c. de agua, se filtra y al filtrado con un total de 7 centímetros cúbicos se añaden los tres correspondientes de la colorimetría del fósforo.

En el caso del benzoil-carbinol se extrae con éter -- después de la filtración.

Los resultados son los siguientes:

19). Acción de la proteína de fosfatasa renal sola y en

presencia de metales:

	H ₂ O	Mg	Zn	Ni	Mg-Zn-Ni-Ca
Proteína de fosfatasa ...	0,76 %	0,88 %	0,21 %	0,55 %	0,53 %

Se ve que la proteína ejerce la débil acción que se disminuye por el conjunto metálico Mg-Zn-Ni-Ca, así como por los metales zinc, níquel y calcio independientemente; el magnesio produce un ligero incremento.

2ª). Acción conjunta de la proteína de fosfatasa y de modelos de la misma:

Proteína	0,76 %
Id. con o-aminobenzoico	0,44 %
Id. p-aminobenzoico	0,60 %
Id. benzolecarbinoi	0,70 %
Id. w-aminoacetofenona	0,80 %
Id. ácido nicotínico	0,59 %
Id. nicotemida	0,73 %

Se observa que la acción que independientemente jerce la proteína sobre el substrate de glicerofosfato sédico -

se encuentra disminuida principalmente por la presencia de los modelos o-aminobenzoico, p-aminobenzoico y ácido nicotínico.

3º). Acción de "proteína" de fosfatasa y modelos conjuntamente con el sistema de metales.

Proteína + (Mg-Zn-Ni-Ca) + o-aminobenzoico	0,33 %
Id. id. p-aminobenzoico	0,41 "
Id. id. benzilcarbinol	0,61 "
Id. id. w-aminocetofenona ...	0,93 "
Id. id. ácido nicotínico	0,49 "
Id. id. nicotamida	0,55 "

La presencia del conjunto metálico sobre el sistema - modelo-proteína ejerce una nueva disminución de la actividad sobre el sustrato de glicerofosfato. Únicamente en el caso de la aminocetofenona la presencia de los metales logra una pequeña elevación del porcentaje en fósforo hidrolizado.

CONCLUSIONES

- 1ª.- El análisis espectral de las cenizas de fosfatasa ósea, preparada según Lora y Rodríguez Blanco, da Ca como elemento más abundante, y después de él, en orden decreciente, Zn, Mg, Ni, Fe y trazas de Na, Si, Sr, y B.
- 2ª.- En las cenizas de fosfatasa renal, obtenidas según la técnica de Albers, se identifica mediante análisis espectral la existencia de Mg, Zn, Ni, Ca y Fe junto con débiles líneas de Na y K.
- 3ª.- El Mg, Zn, Ni y también el Al, activan especialmente al benzoil-carbinol y la *w*-aminoacetofenona, obteniéndose los porcentajes más elevados a 40° y ocho horas de duración del ensayo.
- 4ª.- Durante las experiencias se han caracterizado y preparado las sales de Zn, Ni y Co del ácido *o*-aminobenzóico, así como la 2,5-difenilpiracina, como producto de descomposición de la *w*-aminoacetofenona.
- 5ª.- La adición de globulinas, obtenidas a partir de suero de sangre, a los modelos de fosfatasa no ofrece ningún efecto sensible, ni aún en el caso de empleo simultáneo de iones metálicos.

6^a.- Con "proteína" de fosfatasa, obtenida por electrodiálisis clorhídrica del enzima, se realizan experiencias análogas de copulación con modelos, tanto aislados como en presencia de metales, sin que en ningún caso se obtengan activaciones; pero ninguna interpretación definitiva puede darse a ésta, porque posiblemente la proteína se desnaturaliza en su obtención.

2.- ACCION DE AMINOACIDOS, SOLOS Y CON IONES METALICOS,
SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

- PARTE TEORICA -

A). Introducción al conocimiento de la fosfatasa renal.

Antes de estudiar el efecto de otros tipos de compues-
tos sobre los modelos de fosfatasa, hemos comprobado la ac-
ción que los mismos ejercen sobre la propia enzima, reali-
zando una serie de ensayos previos sobre la fosfatasa de -
origen renal, que no había sido estudiada antes en nuestro
Laboratorio.

Para obtener experiencia propia, definimos ante todo
su zona de pH óptimo, tamponando con solución de acetate -
sódico-veronal sódico / ácido clorhídrico a pH 5.04, 6.04,
6.76, 8.12, 8.45, 8.85, 9.18, 9.58, 9.91, 10.46 y 10.70, la
solución-substrato de glicerofosfato sódico N/20 sobre la
que actúa la fosfatasa durante una hora a 38°, encontrándose
se un máximo de actividad en el intervalo comprendido en-
tre 8.85 y 9.16.

La variación de la concentración del substrato, mantie-
niendo constante el resto de las condiciones experimenta-
les, también es causa de variación del porcentaje de fósfo

re liberado, como era de prever, en el sentido de que éste aumenta a medida que la concentración disminuye.

Al aumentar el tiempo durante el cual la fosfatasa -- ejerce su acción enzimática sobre el glicerofosfato sódico crece asimismo la cantidad de P liberado, pero ya con una hora de acción se ha hidrolizado más del 50% del éster utilizado como substrate.

Con el fin de investigar la acción de los iones metálicos sobre la actividad de la fosfatasa renal, preparamos una serie de ensayos en los que juntamente con la enzima -- actúan sobre el substrate de glicerofosfato sódico los metales magnesio, cinc, níquel, calcio, aluminio, sodio, bario y manganeso a pH 6,8, durante una hora a 37-38°, y el Mg, Zn y Ni además a los pH 5,3 y 9,16 en las mismas condiciones experimentales. De todos ellos ejercen acción apreciable sobre la actividad enzimática de la fosfatasa, el magnesio, el cinc y el níquel. El cinc y el níquel son causa de notable inactivación a todo lo largo de la escala de pH ensayado y el magnesio en las mismas condiciones experimentales incrementa el porcentaje de P hidrolizado.

En una serie de ensayos en los que se hace variar la concentración del magnesio que actúa simultáneamente con la fosfatasa sobre el substrate, se observa que no es apta cualquier concentración para producir incremento en la actividad enzimática de la enzima e incluso a M/5 hace deg --

cender el porcentaje de P hidrolizado.

B). Acción comparada de esterasa y amidasa en la fosfatasa renal y su influencia por aminoácidos, sales y con iones metálicos.

En el orden de estudio propuesto, se han estudiado -- comparativamente las actividades de esterasa y de fosfamida de la fosfatasa renal actuando simultánea y respectivamente sobre sustrato de glicerofosfato sódico y aminofosfonato de dibencilo. En idénticas condiciones experimentales de tiempo, temperatura, concentración del sustrato, cantidad de fosfatasa, pH, etc. el porcentaje de fósforo liberado en ambos casos es completamente distinto y muy superior en el del éster fosfórico.

El fósforo liberado por el sustrato fosfamídico apenas experimenta variación al pasar de pH neutro a ácido -- (5.3) e alcalino (9.16); sin embargo, aumenta apreciablemente el porcentaje de P hidrolizado de la fosfamida al disminuir su concentración y en todos los valores de pH ensayados, aunque en todo momento se mantiene notablemente inferior a los valores correspondientes presentados por el glicerofosfato sódico.

También cuando la cantidad de enzima que actúa sobre el aminofosfonato de dibencilo aumenta, el porcentaje de fósforo liberado crece apreciablemente.

En una serie de ensayos simultáneos investigamos la posible influencia que ejercerían los iones metálicos sobre la fosfatasa al actuar conjuntamente sobre el sustrato fosfámico, comparados con los mismos resultados presentados en el caso del éster fosfórico como sustrato; en el caso de la amida fosfórica $N/100$ a pH ácido, neutro y alcalino, el porcentaje de P separado por la fosfatasa renal no se ve influenciado de una manera clara por la presencia de los metales zinc, níquel, magnesio y calcio.

Esto sentado prosiguiendo la dirección de ensayar conjuntamente con los modelos de fosfatasa, sustancias capaces de hacer variar su actividad, habíamos de investigar seguidamente la acción que sobre ellos ejercerían otro tipo de compuestos interesantes bajo el doble aspecto de constituyentes del opsonina protéico y de efectores de la fosfatasa: los aminoácidos.

Los aminoácidos se encuentran entre el gran número de sustancias estudiadas como capaces de modificar la actividad enzimática de la fosfatasa. Van Thoen (1) y Aebi y Aglitz (2) ofrecen los mejores trabajos de conjunto sobre efectores de fosfatasa entre los cuales predominan grandemente los inhibidores.

(1).- Tesis doctoral, M. Declume, Lens-le-Saunier, 182 pág.

(2).- Helv. Chim. Acta, 31, 1948, 1948.

Bedansky (1) investiga el mecanismo de desactivación ocasionada por los aminoácidos.

En los preparados de huesos no han sido encontradas sustancias desactivantes según Dawkin y Bedansky (2), en oposición a las de intestino y riñón, lo que ya había sido observado por Kldbacher y Kutscher (3) en preparados impuros de tejidohepático. A. y E. Albers (4) han confirmado estos resultados en el caso de tejido renal. Estas sustancias desactivantes que acompañan al enzima fueron definidas por Kldbacher y Kutscher (5) como glutatión e cistina, y han sido identificadas por O. Bedansky como aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas.

Por su parte Asbi y Abelin (6) encuentran que los aminoácidos ácido 1(+) glutámico, glicocola y 1(+) lisina, ocasionan descenso en la actividad fosfatásica de preparados de tejido renal, siendo este descenso máximo en los aminoácidos básicos y mínimo en los ácidos.

La influencia que los aminoácidos a concentraciones

(1).- J. Biol. Chem. 165, 605, 1946; 174, 465, 1948.

(2).- J. Biol. Chem. 101, 641, 1933.

(3).- Z. Physiol. Ch. 207, 1, 1932.

(4).- Z. Physiol. Ch. 232, 165, 189, 1935.

(5).- Helv. Chim. Acta, 31, 1761, 1948.

(6).- Helv. Chim. Acta, 31, 1943, 1948.

M/2 y M/20 ejercen sobre la fosfatasa renal actuando sobre glicerofosfato sódico durante una hora, a pH óptimo 9.16 no presenta apenas valor apreciable en los casos de alanina y lisina a ambas concentraciones; sin embargo es manifiesta la inactivación ejercida tanto a M/2 como a M/20 por la cisteína que llega a disminuir el porcentaje de fósforo hidrolizable del 60% al 1.4%.

En una serie de experiencias se investiga la acción conjunta aminoácido-metal sobre la fosfatasa actuando en las mismas condiciones experimentales anteriores. Los iones metálicos empleados son: Zn, Ni y Mg a concentraciones M/20, cada uno de los cuales actúa separadamente con glicocola, alanina y lisina, bien M/2 ó M/20.

La presencia del zinc es causa de inactivación de la enzima aun en presencia de glicocola, alanina y lisina, si bien no es tan enérgica como en el caso de no estar presentes los aminoácidos.

El níquel ya no tiene tan marcada influencia desactivante en presencia de los aminoácidos como cuando se le hacía actuar solo sobre la fosfatasa, siendo marcada la diferencia existente en la acción conjunta según que la concentración del aminoácido sea M/2 ó M/20 en el sentido de ser notablemente superior la inactivación en el primer caso.

El magnesio, aun en presencia de los aminoácidos, ejerce su función activadora siendo asimismo de destacar la in-

fluencia que sobre ella ejerce la concentración del aminoácido; a mayor concentración de éste la activación es menor.

El hecho es general, a mayor concentración del aminoácido el porcentaje de fósforo hidrolizado es menor, independientemente de la acción activante o desactivante que ejercería el metal solo.

C). Acción de los aminoácidos sobre los modelos de fosfatasa.

Pasando ya de la fosfatasa a sus modelos, se ensayó en primer lugar la acción independiente que pudieran ejercer los aminoácidos glicocola, lisina, ácido aspártico y cisteína, sobre el mismo sustrato y en las mismas condiciones experimentales. Los aminoácidos anteriores se ensayan a concentraciones $N/2$, $N/10$ y $N/20$ a pH 7 actuando durante cuatro horas a 50° , encontrándose débiles acciones sobre el glicero-fosfato sódico por parte de la glicocola y lisina y algo más notables con cisteína y sobre todo con el ácido aspártico; en todos los casos el porcentaje de fósforo liberado es tanto mayor cuanto mayor es la concentración del aminoácido.

Como quiera que sobre los modelos de fosfatasa habrá de ensayarse asimismo la influencia conjunta aminoácido-ión metálico, investigamos también la variación que experimenta la acción debida independientemente a los aminoácidos por la presencia de metales, y así a la glicocola, lisina, cis-

teína y ácido aspártico $N/20$ les hacemos actuar con magnesio, calcio, níquel y cinc bajo las mismas condiciones experimentales anteriores encontrando que el Ni ocasiona aumento de actividad en presencia de los cuatro aminoácidos, siendo máxima en el caso de la cisteína; en el resto de los casos, excepción del cisteína-Zn, los metales ocasionan disminución de la actividad que independientemente ejercía sobre el sustrato el aminoácido respectivo, llegando algunas veces incluso a anularla.

Con estos resultados experimentales como antecedente, tanto los aminoácidos como el sistema aminoácido-metal, se hicieron actuar sobre los modelos de fosfatasa, ácidos orto y para-aminobenzóicos, *w*-aminoacetofenona, ácido nicotínico y benzoil-carbinol y el conjunto se calienta con el sustrato de glicerofosfato sódico tamponado a pH 7 durante cuatro horas a 60°; los aminoácidos alanina, glicocola, lisina, cisteína y ácido aspártico se utilizan a concentraciones $N/2$ y $N/10$. La actividad que posee el modelo *o*-aminobenzóico, se ve disminuida por la presencia de todos los aminoácidos ensayados, y a las dos concentraciones de éstos y aumenta en relación con la presentada por el aminoácido actuando independientemente sobre el sustrato.

En el caso del *p*-aminobenzóico la actividad disminuye también cuando los aminoácidos están presentes, siendo mayor el descenso experimentado cuando la concentración de él

tes es menor.

La acción independiente de la *w*-aminoacetofenona sobre el glicerofosfato en las mismas condiciones experimentales se encuentra en todos los casos ensayados disminuida por la presencia de los correspondientes aminoácidos.

Los porcentajes encontrados en los testigos que nos -- muestran la acción que ejerce el ácido nicotínico como modelo de fosfatasa se encuentran disminuidos aunque no en una proporción por todos los aminoácidos ensayados; la cisteína y el ácido aspártico que aisladamente presentan la mayor actividad de los aminoácidos ensayados son los que ocasionan a su vez una disminución menor en la actividad del modelo aislado.

La débil actividad que presenta el benzil-carbinol independientemente sobre el sustrato de glicerofosfato sódico como modelo de fosfatasa, se encuentra, en general, incrementada por los aminoácidos con los que se ha ensayado conjuntamente, resultando también ligeramente incrementada la acción independiente del aminoácido.

Quando el conjunto modelo-amino-ácido se repite con -- adición respectiva de los iones metálicos Mg, Zn, Ni y Ca, tenemos una serie de ensayos en los que se pone de manifiesto la variación que en la actividad del modelo ejerce el sistema aminoácido-ión metálico que ya ha sido independientemente ensayado sobre el mismo sustrato y en igualdad de condiciones experimentales. En el caso del *o*-aminobenzóico,

hay siempre disminución con relación al fósforo liberado independientemente por el modelo, existiendo también disminución con relación al sistema aminoácido-modelo.

En general, en el caso del modelo p-aminobenzóico, hay disminución del valor correspondiente al del modelo solo - aunque se eleva el del conjunto modelo-aminoácido en ausencia de metales; el valor del sistema modelo-cisteína-cinc - está en consonancia con el también elevado porcentaje obtenido en ensayos anteriores para cisteína-cinc.

Los valores correspondientes al conjunto w-aminoacetofenona-aminoácido-metal son en todo momento inferiores al valor presentado por el modelo aislado y apenas presenta variación notable con relación al porcentaje de fósforo liberado por el sistema aminoácido-modelo en ausencia de metal.

Aunque en pequeña proporción también se encuentran disminuidos los porcentajes del ácido nicotínico-aminoácido -- por la presencia de metales; ya anteriormente el aminoácido había disminuido la acción independiente del modelo; únicamente hay una elevación algo apreciable en el sistema modelo-cisteína-cinc, de acuerdo con incrementos análogos observados anteriormente y con la elevación propia del sistema cisteína-cinc aislado.

En el caso del benzoin-carbinoel la presencia de metales ocasiona, sobre todo en el caso de empleo de Zn, dismi-

nación de la actividad con relación al sistema modelo-aminoglicido que como se recordará resultó asimismo débilmente incrementada con relación a la acción independiente del modelo aislado; el ácido aspártico que presenta, tanto aislado, como unido al benzil-carbinol, acción relativamente energética sobre el sustrato, es por tanto, el que ofrece cifras de fósforo hidrolizado más elevadas; también el cinc en este caso hace descender notablemente el porcentaje.

PARTE EXPERIMENTAL

A).- INTRODUCCION AL CONOCIMIENTO DE LA FOSFATASA RENAL

DISCRIMINACION PREVIA DEL EFECTO DEL TAMPON EN PRESENCIA

DE IONES METALICOS; RAZON DE LA PREFERENCIA POR EL VERONAL

Como habia de utilizarse una solución tampón en las investigaciones de actividad de fosfatasa y modelos de fosfatasa sobre un sustrato de glicerofosfato sódico a distintos pH, actuando tanto aislados como en presencia de ciertas sustancias que habian de ensayarse como activantes de su acción enzimática: aminoácidos, metales, hubo que pensar en la elección de una solución que pudiera actuar a lo largo de toda la escala de pH para evitar dentro de ella misma las posibles variaciones que en los efectos activantes e -- desactivantes pudieran ejercer las distintas sustancias utilizadas en su regulación.

El tampón citrato-NaOH e citrato-ClH presentaba anomalías cuando observábamos la acción de los metales sobre los modelos de fosfatasa en el sentido de disminuir su acción -- independiente sobre el sustrato. Como además los distintos tampones que utilizan soluciones a base de fosfato estan -- dados lógicamente en nuestro caso, la elección queda limitada mayormente a los de glicocela, acetato-veronal y cloruro amónico-amoniaco. Este último vería limitado su empleo al -- campo alcalino y la introducción de la glicocela en un sistema en el que vamos a ensayar distintos aminoácidos con -- posibilidades de interacción no sería apropiada.

Ensayada la actividad de la fosfatasa renal utilizando tampón de cloruro amónico-amoniaco comparativamente con la que presenta disponiendo de las soluciones reguladoras de -- glicocela-NaOH y acetato-veronal al mismo pH óptimo del enzima 9,16, se encuentran valores de P hidrolizado netamente -- más elevados en el primer caso en relación con los -- valores coincidentes empleando los dos últimos. Cuando a refg

rido pH se investiga la influencia de los distintos metales (Zn, Ni, Mg) sobre la fosfatasa se encuentra asimismo en el caso de empleo de cloruro amónico-amoniaco valores excesivamente altos en relación con los mostrados por los otros tapones. En ensayos verificados a otros pH distintos del óptimo la acción difiere asimismo en el caso del cloruro amónico-amoniaco.

Los ensayos realizados con glicocela a pH 9,16 de actividad de la fosfatasa en presencia de metales ofrecen resultados coincidentes con los obtenidos utilizando acetato-veronal, pero la regulación del pH no alcanza toda la zona necesaria para las experiencias que habrán de realizarse.

La aplicación del acetato-veronal en toda la extensión de la escala de pH, la regularidad en los resultados con él obtenidos en ensayos previos de actividad de fosfatasa tanto sola como en presencia de iones metálicos y la ausencia del inconveniente citado en la utilización de la glicocela al ensayar influencias debidas a la presencia de aminoácidos hacen de este tampón el más apropiado para los ensayos que a continuación se realizan.

ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA RENAL.-

a.- Medida de la actividad enzimática.-

En el estudio cuantitativo de la actividad de la enzima utilizamos un método analítico seguro que nos permite determinar al término de su acción la cantidad de fósforo inorgánico liberado dosificándole según la técnica colorimétrica de Brigg (1) fundada en la reducción del fosfomolibdato amónico a azul de molibdeno por la acción de la mezcla hidroquinona-sulfito sódico.

La técnica original se ha modificado (2) adaptándola a las condiciones exigidas por las peculiares características de los líquidos que se ensayan, los cuales contienen cantidades pequeñas de sustancias precipitables por ácido tricloroacético.

Las características del conjunto de hidrólisis varían según el problema que se plantea en el ensayo correspondiente -concentración del substrate, pH, cantidad de la enzima - así como las condiciones experimentales -temperatura, tiempo...- de cada operación.

Una vez transcurrido el tiempo de acción de la enzima y suspendida su actividad por un descenso rápido de tempera

(1).- Brigg. J. Biol. Chem. 59, 255, 1924.

(2).- Lora y Segovia. Anal. Fis. y Quim. 34, 363, 1936.

tura, las operaciones que siguen a la hidrólisis van fundamentalmente dirigidas como se mencionó en el caso correspondiente a la actividad de los modelos, a obtener una disolución de fosfato de concentración adecuada para la mayor exactitud del procedimiento utilizado en la valoración,

El cálculo de la concentración de P en la disolución cuya transparencia se mide fotocolorimétricamente, se hace por medio de la recta extinción-concentración como se expuso asimismo al hablar del P liberado por los modelos.

b.- Determinación del pH óptimo de la fosfatasa renal.

Se utiliza como sustrato 5 c.c. de una disolución de glicerofosfato sódico M/20, a la que se añaden 5 c.c. del tampón correspondiente de acetato-veronal según el pH de que se trate; sobre este conjunto se hace actuar 0,01 grs. de fosfatasa renal recién obtenida en suspensión en 2,5 cc. de agua destilada.

El dispositivo de hidrólisis es como sigue:

	I	II	III	IV	V	VI
Substrato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH	5,04	6,04	6,75	8,12	8,45	8,85
Fosfatasa	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 grs.
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

	VII	VIII	IX	X	XI
Substrate....	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH ...	9,18	9,58	9,91	10,46	10,7
Fosfatasa ...	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01 grs.
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

Simultáneamente se disponen los correspondientes testigos --
sin enzimas:

	I	II	III	IV	V	VI
Substrate...	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH ..	5,04	5,04	6,76	8,12	8,45	8,85
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

	VII	VIII	IX	X	XI
Substrate ...	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH ...	9,18	9,58	9,91	10,46	10,70
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

así como los testigos sin sustrato.

	I	II	III	IV	V	VI
Substrato...	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH ..	5,04	6,04	6,76	8,12	8,45	8,85
Fosfatasa ..	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1grs.
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

	VII	VIII	IX	X	XI
Substrato ..	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón pH ..	9,13	9,58	9,91	10,46	10,70
Fosfatasa ..	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 grs.
Agua	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5 cc.

Estos tres conjuntos se calientan simultáneamente en un termostato a 37-38° durante una hora, al cabo de la cual se introducen inmediatamente los tubos en una mezcla frigorífica para suspender la acción de la enzima.

Del total de 12,5 cc. que componen cada tubo de ensayo, previamente bien homogeneizados, tomamos 1 cc. al que añadimos 8,5 cc. de agua destilada y 0,5 cc. de ácido dicloroacético en solución al 20%; se deja estar unos minutos y se filtra, tomando del filtrado cantidades variables, determinadas en ensayos previos, que se diluyen hasta un total de

siete centímetros cúbicos a los que se añaden los 5 cc. correspondientes de molibdato amónico, hidroquinona y sulfite sódico. Se deja estar el total de 10 cc. durante treinta minutos al cabo de los cuales se hace la lectura colorimétrica.

En este ensayo vamos a exponer los valores de las transparencias observadas, pues ello ha de servir de valiosa orientación en la interpretación relativa de los porcentajes, ya que errores en aquellas perfectamente admisibles -una o dos unidades- se traducen a su vez, por la elevada dilución a que se opera, en varias unidades en los tantos por ciento de P hidrolizado.

Valores de las Transparencias a los distintos pH.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
pH/40s	5,04	6,04	6,76	8,12	8,45	8,85	9,18	9,58	9,91	10,4	10
Tomando 5 cc.	61,5	55									
Tomando 1 cc.	89,8	87,5	37	24	23	22	22	23	23,5	25	31
Tomando 0,5 cc.	94	93		46	43	42,5	42	43	44	45	54
Id. ...							42	43	43,5		
Id. ...					43	42	41	42	43	45	
Id. ...					42	40	40	40,5	42	46	

A partir de las extinciones correspondientes a estas transparencias calculadas en tablas (1) adecuadas, se hallan los miligramos de fósforo existentes en 1 cc. de la solución observada, los cuales multiplicados por la dilución a que se opera nos dan los miligramos de fósforo hidrolizado en 1 cc. de solución original de éster; teniendo en cuenta los miligramos de fósforo existentes en 1 cc. de solución N/20 del sustrato calculamos los porcentajes de P hidrolizado que se exponen en la tabla siguiente. En los cálculos se han descontado las extinciones debidas a los testigos correspondientes.

pH/49	mgms. de P en 1 cc. de solución original del éster.	Porcentaje P hidrolizado.
5,04	0,0800	5,16 %
6,04	0,1015	6,54 "
6,76	0,8750	56,5 "
8,12	1,3000	83,87 "
8,45	1,4500	93,54 "
8,85	1,5000	96,77 "
9,18	1,5600	98,72 "
9,58	1,4750	95,16 "
9,91	1,4500	93,54 "
10,46	1,3000	83,87 "
10,70	0,9500	61,29 "

(1).- A.D. Marensi: "Fotometría y su aplicación al análisis Biológico", pág s. 45-46.

A partir de las extinciones correspondientes a estas transparencias calculadas en tablas (1) adecuadas, se hallan los miligramos de fósforo existentes en 1 cc. de la solución observada, los cuales multiplicados por la dilución a que se opera nos dan los miligramos de fósforo hidrolizado en 1 cc. de solución original de éster; teniendo en cuenta los miligramos de fósforo existentes en 1 cc. de solución N/20 del sustrato calculamos los porcentajes de P hidrolizado que se exponen en la tabla siguiente. En los cálculos se han descontado las extinciones debidas a los testigos correspondientes.

pH/40	mgs. de P en 1 cc. de solución original del éster.	Porcentaje P hidrolizado.
5,04	0,0800	5,16 %
6,04	0,1015	6,54 "
6,70	0,8750	56,5 "
8,12	1,3000	83,87 "
8,45	1,4500	93,54 "
8,85	1,5000	96,77 "
9,18	1,5500	98,72 "
9,58	1,4750	95,16 "
9,91	1,4500	93,54 "
10,46	1,3000	83,87 "
10,70	0,9500	61,29 "

(1).- A. D. Marensi: "Fotometría y su aplicación al análisis Biológico", pág. n. 45-46.

Estos resultados se expresan gráficamente en la gráfica 2.

De ello se deduce que en las condiciones experimentales anteriormente fijadas de tiempo, temperatura y concentración, el pH óptimo para la acción de la fosfatasa renal, está comprendido en la zona 8,85 - 9,18.

c.- Influencia de la concentración del sustrato.

Este ensayo se realiza a pH constante 6,76/40° calentando en termostato a 37-38° durante una hora 5 cc. de solución de glicerofosfato sódico a distintas concentraciones, 5 cc. del tampón correspondiente de acetato-veronal y 0,01 grs. de fosfatasa suspendida en 2,5 cc. de agua destilada con arreglo al siguiente dispositivo:

	I	II	III	IV	V
5 cc. sustrato	M	M/2	M/10	M/20	M/100
Tampón pH 6,76	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Fosfatasa grs.	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Agua cc.	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Con los correspondientes testigos sin enzima.

	I	II	III	IV	V
5 cc. substrate	M	M/2	M/10	M/20	M/100
Tampón pH 6,76	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Agua cc.	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

y testigos sin substrate.

5 c.c. H₂O

5 c.c. tampón pH 6,76

0,01 grs. de fosfatasa

2,5 c.c. agua

La valoración del fósforo liberado en cada uno de los ensayos se realiza según la manera descrita en el apartado anterior y con la dilución correspondiente al pH análogo 6,76.

El resultado es el siguiente:

Concentración	mgs. de P presentes en 1 cc.	Mgs. de P hidrolizados	Porcentaje
M	31,5	3,65	11,4
M/2	15,75	4,05	25,7
M/10	3,15	1,20	34,9
M/20	1,57	1,09	70,0
M/100	0,315	0,25	79,3

De esta serie de resultados se concluye que la hidrólisis -

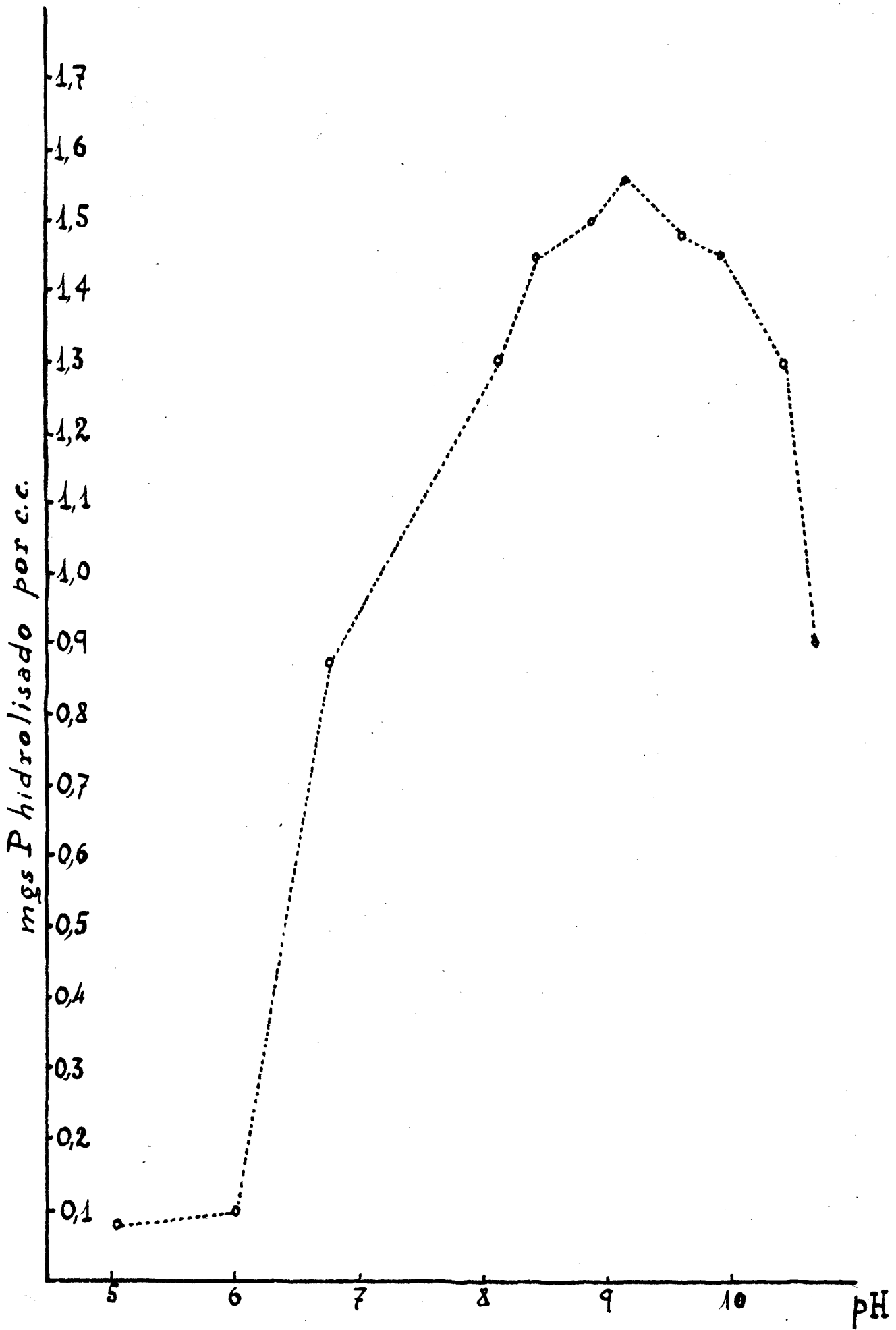


Gráfico nº 2

Variación del P hidrolizado con el pH



umenta a medida que disminuye la concentración del substrato sobre el que actúa la fosfatasa renal.

d.- Influencia del tiempo de acción de la enzima.

El dispositivo de hidrólisis es único:

I	II	III
5 cc. éster N/20 5 cc. tampón veronal 6,76 0,01 grs. fosfatasa 2,5 c.c. agua	Id.	Id.

con los testigos correspondientes sin enzima y sin substrato:

I'	II'	III'
5 cc. éster N/20 5 cc. tampón 6,76 2,5 c.c. agua	Id.	Id.

I''	II''	III''
5 c.c. agua		
5 c.c. tampón 6,76	Id.	Id.
0,1 grs. fosfatasa		
2,5 c.c. agua		

la temperatura de calefacción en el termostato es la misma que en los ensayos anteriores 37-38° y el tiempo de duración una, (I, I' y I''), dos (II, II' y II''), y tres horas (III, III' y III''), respectivamente, al cabo de las cuales cesa la acción de la enzima.

La valoración arroja los resultados siguientes:

Tiempo	mgs. de P hidrolizado	Porcentaje
1 hora	0,950	61,2
2 horas	1,250	80,6
3 horas	1,350	97,9

en donde se observa un ascenso en el porcentaje de P liberado con el aumento del tiempo de contacto, pero ya con una hora de acción se ha hidrolizado más del 50 % del éster empleado como sustrato.

e.- Influencia de los iones metálicos sobre la actividad de la fosfatasa renal.

Se determina en este ensayo la variación que experimenta la actividad de la fosfatasa debido a la influencia de los iones metálicos magnesio, cinc, níquel, calcio, aluminio, sodio, hierro y manganeso, todos ellos a concentración $M/20$, sobre un sustrato de glicerofosfato $M/20$ tamponado con solución de acetato-veronal a $37-38^{\circ}$ durante una hora.

I	II
5 c.c. de sustrato	5 c.c. de sustrato
5 c.c. tampón 6,8	5 c.c. tampón 6,8
0,01 grs. fosfatasa	0,01 grs. de fosfatasa
2,5 c.c. de agua	1,5 c.c. de agua
	1 c.c. solución metálica

variando en II la naturaleza del metal utilizado; en los casos de magnesio, cinc y níquel se ensaya asimismo la variación de la influencia con el pH 5,3; 6,8 y 9,16.

Después de la calefacción se enfría con hielo y del total de 12,5 c.c. se toma 1 c.c. al que se añaden 8,5 c.c. de agua y 0,5 c.c. de ácido tricloroacético; se filtra y del filtrado se toman 1 ó 2 c.c., según el fósforo liberado, se diluyen con 7 c.c. y añaden los tres centímetros cúbicos correspondientes de la colorimetría del P.

En estas condiciones experimentales los resultados son los siguientes:

pH	5,3	6,8	9,16
Sin metal ...	6,4%	47 %	63,5 %
Magnesio	8 %	60,7 %	96 %
Cinc	1,8%	5,8 %	15,1 %
Níquel	3,5%	9,3 %	13 %
Calcio		46 %	
Aluminio		8,06 %	
Sodio		47,3 %	
Hierro		44 %	
Manganeso ...		49 %	

De donde se deduce que únicamente el ión magnesio actúa activando la hidrólisis enzimática de la fosfatasa renal. El cinc así como el níquel presentan fuerte inactivación a todos los pH ensayados.

f.- Influencia de la concentración del magnesio en su poder activante.

Se disponen una serie de ensayos de activación de fosfatasa renal por ión magnesio variando únicamente en el dispositivo la concentración de éste. La influencia de la concentración se observa a los pH 5,3; 7,9 y 9,16.

	I	II	III
Ester M/20	5 c.c.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tampón	5,32	7,90	9,16
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M

	I'	II'	III'
Ester M/20	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tampón	5,32	7,90	9,16
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M/20	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M/20	2,5 cc. Mg ⁺⁺ M/20

	I''	II''	III''
Ester M/20	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tampón	5,32	7,90	9,16
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua	1,5 cc.	1,5 cc.	1,5 cc.
	1 cc. Mg ⁺⁺ M/20	1 cc. Mg ⁺⁺ M/20	1 cc. Mg ⁺⁺ M/20

Se disponen asimismo los testigos sin metal:

	I	II	III
Ester M/20	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tampón	5,32	7,90	9,16
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua	2,5 cc.	2,5 cc.	2,5 cc.

Este dispositivo de hidrólisis se calienta durante una hora a 37-38° y se opera después de la calefacción exactamente igual que en el caso anterior.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

pH	5,32	7,9	9,16
2,5 cc. agua	6,4 %	51,9 %	63,5 %
2,5 cc. Mg ⁺⁺ M	1,6 "	20,4 "	37,3 "
2,5 cc. Mg ⁺⁺ M/20	6,8 "	52,0 "	72,4 "
1,5 cc. H ₂ O	8 "	72,5 "	96,1 "
1 cc. Mg M/20			

De donde se deduce que al disminuir la concentración del --
ión magnesio en el sentido indicado se favorece el incremen-
to de la actividad de la fosfatasa, pudiendo llegarse hasta
a producir efecto contrario al perseguido cuando la concen-
tración se eleva; el efecto activador alcanza su máxima po-

tencia en el pH óptimo.

B.- ACCION COMPARADA DE FOSFATASA Y AMIDASA Y SU INFLUENCIA
POR AMINOACIDOS, SOLOS Y CON IONES METALICOS

En esta serie de ensayos procedemos a investigar la acción que posee la fosfatasa renal sobre un substrate de fosfamida (1) en solución acuoso-alcohólica (50 %).

a.- Acción comparada de la enzima:

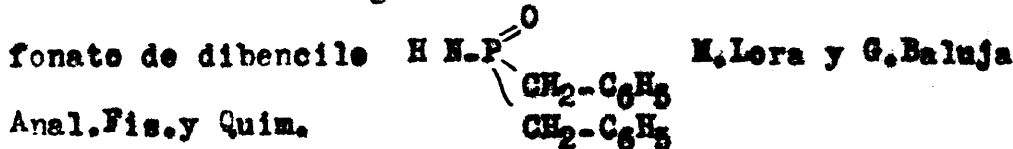
Hacemos actuar en este ensayo la fosfatasa renal sobre substratos de glicerofosfato y fosfamida a concentraciones iguales M/100 tamponados a pH 6,7 con acetate-veronal y calentando el conjunto a 37-38° durante una hora.

En estos ensayos se ha preparado una disolución única de substrato-tampón (pH 6,7) disolviendo la cantidad calculada de glicerofosfato o fosfamida en la solución acetate-veronal de modo que la concentración resultante sea M/100.

El dispositivo de hidrólisis es:

I	II
4 cc. ester M/100-tampón pH 6,7	4 cc. fosfamida M/100-tampón 6,7
0,01 grs. fosfatasa	0,01 grs. fosfatasa
2 cc. agua	2 cc. agua

(1).- Abreviadamente designamos como fosfamida al aminofos-



con los correspondientes testigos sin enzima:

<u>I'</u>	<u>II'</u>
4 cc. ester N/100-tampón pH 6,7	4, cc. fosfamida N/100-tampón 6,7
2 cc. agua	2 cc. agua

y testigos sin substrate

<u>I''</u>	<u>II''</u>
4 cc. tampón pH 6,7	4 cc. tampón pH 6,7
0,01 gr. fosfatasa	0,01 gr. fosfatasa
2 c.c. agua	2 c.c. agua

Enfriando con hielo después de la calefacción, se toman del total bien homogeneizado 4 cc. a los que se añaden 0,5 cc. de ácido tricloroacético al 20% y 3,5 cc. de agua; se filtra y del filtrado se toman 1 ó 5 cc. con dilución hasta un total de siete a los que se añaden los correspondientes a los tres centímetros cúbicos de reactivos.

El resultado de la valoración es:

<u>Substrate</u>	
Glicerofosfato	Fosfamida
mgs. de P hidrolizado/c.c.	0,018
Porcentaje	6 %

Como puede observarse, la fosfatasa renal (que lleva cuatro meses conservada en desecador de vacio) actúa mucho más intensamente sobre el sustrato de glicerofosfato que sobre el de fosfamida.

b.- Variación de la acción de la fosfatasa con el pH.

Como siempre que efectuemos investigaciones utilizando como sustrato el aminofosfonato de dibencilo, hacemos actuar simultáneamente la fosfatasa sobre los correspondientes testigos de glicerofosfato ya que la actividad varía según el grado de conservación de la enzima. Como en el caso anterior la concentración de los sustratos es $N/100$ y estos se encuentran tamponados en la misma disolución con acetato-veronal a pH 5,32, 6,76 y 9,16; sobre ellos se hace actuar la fosfatasa renal durante una hora a la temperatura de 37-38°.

	I	II	III
	4 cc. de glicerofosfato-tampón		
	pH 5,32	pH 6,76	pH 9,16
Fosfatasa ..	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua	2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.

	IV	V	VI
	4 c.c. fosfamida-tampón		
Fosfatasa	5,32 1 ctgr.	6,76 1 ctgr.	9,16 1 ctgr.
Agua	2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.

Con los testigos sin enzima

	I'	II'	III'
	4 cc. glicerofosfato N/100-tampón a pH		
Agua	5,52 2,5 cc.	6,76 2,5 cc.	9,16 2,5 cc.

	IV'	V'	VI'
	4 cc. fosfamida-tampón pH		
Agua	5,32 2,5 cc.	6,76 2,5 cc.	9,16 2,5 cc.

Y testigos sin substrate

	I ^o	II ^o	III ^o
	4 cc. tampón pH	4 cc. tampón	4 cc. tampón
	5,32	6,76	9,16
Fosfatasa ..	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua	2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.

Interrumpida la acción de la enzima al cabo de una hora de calefacción se hace uso en la valoración del fósforo liberado de las operaciones apuntadas en el apartado anterior, dando como resultado:

	<u>S u b s t r a t o</u>					
	Glicerofosfato			Fosfanida		
pH	5,32	6,76	9,16	5,32	6,76	9,16
Mgros. P hidrolisado	0,016	0,090	0,171	0,013	0,018	0,018
% P	5,1	29	55,1	4,2	6	4,8

Se confirma el aumento notable del P hidrolisado a pH alcalino utilizando glicerofosfato como substrato y se observa que apenas existe variación en el caso de la fosfanida tanto a pH ácido como alcalino.

c.- Variación de la acción enzimática de la fosfatasa renal con la concentración del sustrato.

Vamos a ensayar ahora si la acción que la fosfatasa renal ejerce sobre un sustrato de fosfamida experimenta alguna variación con la disminución de la concentración del sustrato. Las concentraciones que vamos a comparar son M/100 y M/463 tanto a pH 7 como 9,16, disponiendo a su vez de los ensayos análogos utilizando glicerofosfato sódico como sustrato. Las condiciones experimentales son como en los casos anteriores una hora de calefacción a 37°-38°, utilizando el siguiente dispositivo de hidrólisis:

I	II	III	IV
4 cc. glicerof. M/100-tampón 7	M/100 cc. glicerof. M/100-tampón 9,16	4 cc. glicerof. M/463-tampón 7	4 cc. glicerof. M/463-tampón 9
Fosfatasa 1 etgr.	1 etgr.	1 etgr.	1 etgr.
Agua . 2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.

V	VI	VII	VIII
4 cc. fosfam, M/100, tampón pH 7	4 cc. fosfam, tampón 9,16	4 cc. fosfam, M/463-tamp. 7	4 cc. fosfam, M/463-tamp. 9,16
Fosfatasa 1 etgr.	1 etgr.	1 etgr.	1 etgr.
Agua 2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.	2 c.c.

Con los correspondientes testigos sin enzima:

I'	II'	III'	IV'
4cc. ester M/100 tampón pH 7	4cc. ester M/100 tampón pH 9,1	4cc. ester M/463 tampón pH 7	4cc. ester M/463 tampón pH 9,1
Agua 2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.

V	VI	VII	VIII
4 cc. fosfamida Tampón pH 7	4 cc. fosfamida Tampón pH 9,1	4 cc. fosfamida Tampón pH 7	4 cc. fosfamida Tampón pH 9,1
Agua 2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.

y testigos sin sustrato:

I''	II''
4 cc. tampón pH 7	4 cc. tampón pH 9,1
1 etgr. fosfatasa	1 etgr. fosfatasa
2 cc. agua	2 cc. agua

Los resultados de la valoración efectuada a la misma dilución de las anteriores experiencias a) y b) y con arreglo a las mismas operaciones subsiguientes a la calefacción son:

Conc. ..	<u>S u b s t r a t o</u>							
	Glicerofosfato				Fosfanida			
	N/100		N/463		N/100		N/463	
pH	7	9,1	7	9,1	7	9,1	7	9,1
mgts. P hidro- lizado	0,090	0,171	0,051	0,065	0,018	0,018	0,014	0,014
% P ..	29	55,1	76	97	6	4,8	20	26

En donde se observa un aumento en el porcentaje de fósforo liberado al disminuir la concentración del substrate de fosfanida; al pasar de pH neutro a alcalino dentro de una misma concentración N/100 o N/463 se observa solamente variación apreciable en la solución de substrate más diluida en el caso de fosfanida.

En un ensayo independiente realizado del anterior investigamos la variación que experimenta la actividad enzimática de la fosfatasa a pH 8,32 con acetato-veronal sobre un substrate de fosfanida con la variación de su concentración según el siguiente esquema:

I	II
4 cc. fosfan. N/100-tampón 8,32	4 cc. fosfan. N/300-pH 8,32
1 ctgr. de fosfatasa	1 ctgr. de fosfatasa
2 c.c. de agua	2 c.c. de agua

y los testigos sin sustrato y sin enzima.

I'	II'	III'
4 cc. tampón pH 5,32	4 cc. fosfamida M/100-tampón 5,3	4 cc. fosfamida M/300-tampón 5,3
1 ctgr. de fosfatasa		
2 c.c. agua	2 c.c. agua	2 c.c. agua

Las operaciones que siguen a la hidrólisis son exactamente iguales a cuando se estudia la misma variación en los pH - neutro y alcalino.

El resultado de la valoración es:

<u>Concentración del sustrato de fosfamida</u>		
	M/100	M/465
Mgs. P hidro- lisado	0,013	0,014
% P	4,2	14

Viéndose asimismo un incremento de la actividad de la fosfatasa renal sobre el sustrato de fosfamida al aumentar la dilución de dicho sustrato a pH 5,3.

d.- Influencia de la cantidad de enzima utilizado.

Para investigar si la cantidad de fosfatasa empleada influye de alguna manera en el porcentaje de fósforo hidrolizado de un sustrato de fosfamida manteniéndose constante el pH y la concentración N/100 del sustrato, calentamos a 37-38° durante una hora el dispositivo:

I	II
4cc.fosfam,N/100-tampón 5,3 0,01 grs. fosfatasa 2 c.c. agua	4 cc.fosfam,N/100-tampón 5,3 0,02 grs. fosfatasa 2 c.c. agua

juntamente con los testigos sin sustrato

I'	II'
4 cc.tampón pH 5,3 0,01 grs. fosfatasa	4 cc.tampón pH 5,3 0,01 grs. fosfatasa

y testigo sin enzima

I''
4 cc.fosfamida N/100-tampón pH 5,3 2 cc. agua

Al final de la hora de calefacción se introduce el conjunto en hielo y previo tratamiento con ácido tricloroacético se lleva a la misma dilución 1 : 30 que en los ensayos anteriores utilizando fosfemida y se valora encontrándose:

	<u>Fosfatasa utilizada</u>	
	<u>1 mgr.</u>	<u>2 mgr.</u>
mgs. de P hidrolizado....	0,013	0,044
% P	4,2	14,2

Observándose que al aumentar la cantidad de enzima que actúa sobre el substrate en la relación de 2 : 1 la acción enzimática aumenta en la relación 3 : 1 aproximadamente.

e.- Influencia de los iones metálicos sobre la actividad enzimática de la fosfatasa actuando sobre substrate de fosfemida.

De la misma manera que ensayamos la influencia que ciertos iones metálicos ejercen sobre la fosfatasa renal actuando sobre un substrate de glicerofosfato sódico, pretendemos investigar ahora las variaciones que debidas a la misma presencia experimenta la actividad de la fosfatasa sobre un substrate de fosfemida. Se ensayan los metales cinc, níquel, magnesio y calcio a concentración $M/20$ juntamente con la fos

fosfatasa sobre fosfamida $M/100$ -tampón de acetato-veronal a --
 los pH 5,32, 7 y 9,16 comparándole en todo momento con los
 testigos correspondientes que utilizan glicerofosfato sódico
 $M/100$ como sustrato ya que la actividad de la fosfatasa
 como dijimos en otra ocasión varía grandemente con el modo,
 tiempo de conservación etc. lo que obliga a hacer siempre -
 simultáneamente al ensayo problema, el ensayo testigo con -
 la misma fosfatasa utilizada.

El dispositivo de hidrólisis siguiente se calienta una
 hora a 37-38°:

	I	II	III	IV	V
Fosfamida- tampón pH 5,32 ..	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Fosfatasa; 2 c.c. ...	1 ctgr. H ₂ O	1 ctgr. H ₂ O-Zn	1 ctgr. H ₂ O-Ni	1 ctgr. H ₂ O-Mg	1 ctgr. H ₂ O-Ca

	I'	II'	III'	IV'	V'
Glicerofo- sato-tampón pH 5,32 ...	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Fosfatasa . 2 c.c.	1 ctgr. H ₂ O	1 ctgr. H ₂ O-Zn	1 ctgr. H ₂ O-Ni	1 ctgr. H ₂ O-Mg	1 ctgr. H ₂ O-Ca

repetiéndose asimismo todo este sistema para los pH 7 y 9,16.

Una vez terminada la calefacción se enfría con hielo tomándose 4 c.c. a los que se añaden 0,5 c.c. de ácido tricloroacético y 3,5 c.c. de agua; se filtra y el c.c. del filtrado se lleva a 7 c.c. con agua destilada a los que se añaden los tres correspondientes de la colorimetría del fósforo.

Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas son los siguientes:

Fosfomida

pH	H ₂ O	Zn	Ni	Hg	Ca
5,32	4,32 %	3,8 %	3,8 %	5,1 %	4,2
7	6	3,8	5	5	4,8
9,16	4,8	4,2	4,9	5	4,2

Glicerofosfato

pH	H ₂ O	Zn	Ni	Hg	Ca
5,32	5,4	1,7	3,1	6,7	4,8
7	29	5,1	8,3	33,2	27,3
9,16	55,1	6,7	15,4	67,3	49,5

Del examen de los anteriores resultados se deduce que utilizando sustrato de fosfomida N/100 no existe variación apre-

ciable en la actividad de la fosfatasa renal haciendo intervenir simultáneamente los iones metálicos zinc, níquel, magnesio y calcio a pH ácido, neutro y alcalina.

ACCION DE AMINOACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA RENAL.

a.- Acción aislada de varios aminoácidos sobre la fosfatasa

Utilizamos los aminoácidos alanina, lisina y cisteina a concentraciones M/2 y M/20 actuando conjuntamente con la fosfatasa renal sobre un substrate de glicerofosfato sódico M/20 tamponando con acetato-veronal a pH 9,16, óptimo de la fosfatasa, con arreglo al siguiente conjunto de hidrólisis:

	I	II	III	IV
Glicerofosfato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón 9,16 ..	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua	2,5 cc.	1,5 cc.	1,5 cc.	1,5 cc.
1 cc. aminoácido M/2	-	Alanina	Lisina	Cisteina

Los ensayos II, III y IV se repiten a concentraciones M/20 del aminoácido utilizado.

El conjunto se calienta a 38-39° durante una hora, se

enfria con hielo y del total se toma 1 c.c. al que se añaden 8,5 c.c. de agua destilada y 0,5 c.c. de ácido trislerg acético; se filtra, y se toma 1 c.c. que se diluye hasta un total de siete a los que se añaden los reactivos de la colorimetría.

Los resultados son los siguientes:

Aminoácido	M/2	M/20
Sin "	60,6 %	
Alanina	58,4 %	60 %
Lisina	60,0 %	62 %
Cisteina	1,4 %	1,9%

De donde se deduce que los aminoácidos alanina y lisina no ejercen influencia alguna sobre la actividad de la fosfatasa renal en las condiciones experimentales citadas, tanto a concentración M/2 como a M/20. La cisteina a ambas concentraciones es causa de inactividad manifiesta.

b.- Acción conjunta aminoácido-ión metálica sobre la actividad de la fosfatasa renal.

Se investiga la acción de los metales cinc, níquel y magnesio juntamente con los aminoácidos glicocola, alanina y lisina a concentraciones M/2 y M/20 en la actividad de la fosfatasa re-

nal con arreglo al siguiente dispositivo:

	I	II	III	IV	V
Ester N/20	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Tampón 9.1	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
Fosfatasa	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
1 cc. aminoácido ..	glicocola/20	alanina/20	alanina/20	lisina/20	Lisina/20
1 cc. sol. N/20	Zn ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Zn ⁺⁺
Agua	0,5 cc.	0,5 cc.	0,5 cc.	0,5 cc.	0,5 cc.

Una serie de ensayos exactamente iguales a los anteriores se repiten con la única variación de la sustitución del ión metálico Zn⁺⁺, por los Ni⁺⁺ y Mg⁺⁺.

Finalizada la calefacción durante una hora a 37-38° se opera con el referido conjunto exactamente igual que en el caso de aminoácido solo.

Los resultados se esquematizan a continuación:

Metal	Zn	Ni	Mg
<u>Aminoácido</u>	<u>Concentración</u>		
Glicocola	N/2	34,5	56 82
	N/20 ...		
Alanina	N/2	32,2	30,6 69
	N/20 ...	32,2	56 96
Lisina	N/2	20,9	29 64,4
	N/20 ...	30,6	56 93

Del examen de los resultados expuestos se deduce: 1º). El cinc aun en presencia de los aminoácidos ensayados es causa de inactivación de la fosfatasa si bien en menor grado que la producida en ausencia de aquellos. 2º). El níquel en presencia de los mismos aminoácidos también es causa de inactivación aunque en menor grado que el cinc y en también mucho menor grado que la producida solamente por el metal actuando sobre la fosfatasa. 3º). Cuando el magnesio está presente y la concentración del aminoácido es $N/20$ la actividad de la fosfatasa aumenta aproximadamente en igual grado que cuando el aminoácido no está presente; en cambio, si la concentración del aminoácido es $N/2$ no hay variación muy sensible en la actividad de la fosfatasa.

C). ACCION DE AMINOACIDOS CON Y SIN METAL SOBRE MODELOS DE FOSFATASA

1.- Acción de los aminoácidos sobre el substrate de glicerofosfato sódico.

Se ensayan los aminoácidos glicocola, lisina, cisteína y ácido aspártico a concentraciones $N/2$, $N/10$ y $N/20$ actuando sobre un substrate de glicerofosfato sódico $N/20$ tamponando con acetato-veronal a pH 7. El substrate se disuelve en la disolución tampón, resultando una concentración de la disolución substrate-tampón $N/20$, y de ella se toman para cada ensayo 4 cc.; el dispositivo de hidrólisis es el siguiente:

	I	II	III
Substrate-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. <u>glicocola</u> de conc.	N/2	N/10	N/20

	I'	II'	III'
Substrate-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. <u>lisina</u> de conc.	N/2	N/10	N/20

	I''	II''	III''
Substrate-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. <u>a. mandílica</u> conc.	N/2	N/10	N/20

	I'''	II'''
Substrate-tampón pH 8	4 cc.	4 cc.
Agua	1 cc.	1 cc.
1 cc. <u>cisteina</u> de conc.	N/10	N/20

Como el ácido aspártico no se disuelve a la temperatura ordinaria para dar lugar a disoluciones que posean la concentración deseada, ponemos la cantidad correspondiente cuidadosamente pesada y el centímetro cúbico de agua destilada equivalente al disolvente de las disoluciones empleadas en los otros casos. Con la temperatura utilizada en los ensayos logra el aminoácido disolverse.

Este conjunto anterior se calienta a 80° durante cuatro horas y al final de ellas se enfría y al total de 6 cc. añadimos 4 cc. de agua destilada. De los 10 cc. resultantes se toman 2 cc. y se diluyen con agua hasta 7 cc. a los que se añaden los tres correspondientes de los reactivos.

Al destapar los tubos de ensayo en los que se ensaya la acción de la cisteína se observa un fuerte olor a SH_2 .

Los resultados obtenidos son los siguientes:

<u>Aminoácido</u>	<u>% P liberado</u>		
	<u>N/2</u>	<u>N/10</u>	<u>N/20</u>
Glicocola ...	0,6	0,4	0,2
Lisina	0,7	0,4	0,3
Cisteína	-	1,5	0,6
A. aspártico:	3,4	2,2	1,4

Como se ve, todos los aminoácidos ensayados ejercen se-

ción sobre el substrato de glicerofosfato, máxima en el caso del ácido aspártico, que varía directamente con la concentración del aminoácido.

II.- Influencia de la presencia de iones metálicos sobre la acción independiente de los aminoácidos.

Se utilizan los aminoácidos glicocela, lisina, cisteína, y ácido aspártico a concentración N/10 y sobre ellos se hacen actuar los metales, magnesio, calcio, níquel y cinc, cuyo conjunto se pone en presencia del substrato-tampón -- pH 7:

	I	II	III	IV
Substrato-tampón 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
1 cc. de N/10	Glicocela	Glicocela	Glicocela	Glicocela
1 cc. sol. N/20 ..	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Zn ⁺⁺

	I'	II'	III'	IV'
Substrato-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
1 cc. N/10 de	Lisina	Lisina	Lisina	Lisina
1 cc. sol. N/20	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Zn ⁺⁺

	I''	II''	III''	IV''
Substrato-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
1 cc. N/10 de	Cisteína	Cisteína	Cisteína	Cisteína
1 cc. sol. N/20 ...	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Zn ⁺⁺

	I	II	III	IV
Subst.-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
1 cc. N/10 de	a.aspártico	a.aspártico	a.aspártico	a.aspártico
1 cc. sol. N/20	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Zn ⁺⁺

Todo el anterior dispositivo de hidrólisis se calienta a 80° durante cuatro horas al cabo de las cuales se opera como en el ensayo anterior.

En el ensayo cisteína N/10-niquel se observa la formación de una intensa coloración rojo-vinosa.

Los porcentajes de fósforo liberado en cada uno de los ensayos se exponen a continuación:

Aminoácido N/10	Hg	Cu	Ni	Zn
Glicocola ..	0	0,08	1,1	0,3
Lisina	0,08	0,3	0,8	0
Cisteína ...	1,1	1,4	2,3	3,4
A. aspártico	0,8	0	1,7	1,8

En ellos puede observarse que el Ni en presencia de los aminoácidos glicocola, lisina y cisteína eleva el porcentaje del P hidrolizado con relación a la acción independiente del aminoácido; el resto de los metales ensayados disminuyen la acción que posee el aminoácido llegando incluso a anularla en algunos casos.

III.- Acción de aminoácidos sobre modelos de fosfatasa

Se ensayaron esta serie de experiencias la influencia que los aminoácidos alanina, glicocola, lisina, cisteína y ácido aspártico ejercen a concentraciones N/2 y N/10 sobre los modelos ácido -aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, ω-aminocetofenona, ácido nicotínico y benzoin-carbinol.

Se calienta durante cuatro horas a 80° el siguiente dispositivo de hidrólisis:

o-aminobenzóico

	I	II	III	IV
Substrate-tampón 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido .	-	Glicocola N/2	Glicocola N/10	Lisina N/2

	V	VI	VII	VIII
Substrate-ta pen 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. amino- ácido ...	Lisina N/10	a.aspártico N/2	a.aspártico N/10	Cisteina N/10

p-aminobenzóico

	I	II	III	IV
Subst.-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Agua	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido ..	-	glicocola N/2	glicocola N/10	lisina N/2

	V	VI	VII	VIII
Subst.-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido ..	Lisina N/10	aspartico N/2	aspartico N/10	cisteína N/10

L-aminocetofenona

	I	II	III	IV
Subst. tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol	0,2 mmol
Agua	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido.	-	alanina N/2	glicocela N/2	lisina N/2

Acido nicotínico

	I	II	III	IV	V
Subst.-tampón 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido	-	alanina N/2	alanina N/10	lisina N/2	lisina N/10

	VI	VII	VIII	IX
Subst.-tampón 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc.aminoácido	Cisteína M/2	Cisteína M/10	a.aspártico M/2	a.aspártico M/10

Benzoil-carbinal

	I	II	III	IV
Subst.-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua	2 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc.aminoácido ..	-	alanina M/2	alanina M/10	glicocola M/2

	V	VI	VII	VIII
Subst.-tampón pH 7	4 cc.	4 cc.	4 cc.	4 cc.
Modelo	0,2 mmol	0,2mmol	0,2mmol	0,2mmol
Agua	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
1 cc. aminoácido .	Lisina M/2	Lisina M/10	a.aspártico M/2	a.aspártico M/10

Después de la calificación se opera como en los ensayos anteriores, siendo el resultado de la hidrólisis los valores esquematizados en la tabla siguientes:

T A B L A V I

Modelo	Sin em- pedido	Alanina		Glicocola		Malina		Orotidina		Asparto		
		M/2	M/20	M/2	M/20	M/2	M/20	M/2	M/20	M/2	M/20	
p-aminobenzico	3,78	-	-	1,1	0,7	1,6	0,7	-	-	1,5	1,5	0,8
o-aminobenzico	3,7	-	-	1,9	1,4	2,2	2,8	-	-	2,8	2,8	3,2
w-aminocetico	4,4	1,5	-	1,7	-	1,7	-	-	-	-	-	-
a. nicotínico	2,2	1,6	1,5	-	-	1,5	2,5	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6
Benzil-carbino	0,8	0,8	0,4	1,1	-	0,4	0,5	-	-	-	3,0	1,2

Los valores correspondientes de la aminocetico se han obtenido con la subacción previa del modelo con el aminoácido correspondiente durante esos meses.

En la tabla anterior de los porcentajes de p hidrolisados por los modelos en su acción conjunta con los aminoácidos sobre el substrate de glicerofosfato sódico y en las condiciones experimentales fijadas, puede observarse:

1a). Los aminoácidos son en todos los casos causa de la disminución de la actividad del ácido p-aminobenzóico; al disminuir la concentración del aminoácido es mayor el descenso que experimenta la actividad del modelo.

2a). La actividad que posee el modelo o-aminobenzóico se ve asimismo disminuida por la presencia de todos los aminoácidos ensayados y a las dos concentraciones de éstos. Igual que en el caso anterior la actividad aumenta en relación con la presentada por el aminoácido actuando independientemente sobre el substrate. Las variaciones son pequeñas y oscilan en ambos sentidos cuando las concentraciones de los aminoácidos pasan de M/2 a M/10.

3a). La acción independiente de la aminoacetofenona sobre el glicerofosfato en las mismas condiciones experimentales se encuentra en todos los casos ensayados disminuida por la presencia de los aminoácidos correspondientes.

4a). Los porcentajes encontrados en los testigos que nos muestran la acción que ejerce el ácido nicotínico como modelo de fosfatasa, se encuentran disminuidos aunque no en mucha proporción por todos los aminoácidos ensayados. La cisteína y el ácido aspártico, que aisladamente presentan la mayor

actividad de los aminoácidos ensayados, son los que ocasionan a su vez una disminución menor en la actividad del modelo aislado.

5a). La débil actividad que presenta el benzil-carbimil - independientemente sobre el sustrato de glicerofosfato se dice como modelo de fosfatasa se encuentra en general incrementada por los aminoácidos con los que se ha ensayado conjuntamente. La acción independiente del aminoácido también resulta ligeramente incrementada.

IV.- Acción conjunta del sistema aminoácido-ión metálico sobre modelos de fosfatasa.

Sobre cuatro centímetros cúbicos de disolución sustrato-tampón pH 7 actúan 0,2 milimoles del modelo correspondiente conjuntamente con 1 cc. de disolución N/10 del aminoácido y 1 cc. de disolución N/20 del ión metálico respectivo.

En el dispositivo de hidrólisis anterior se sustituye el centímetro cúbico de agua por 1 cc. del ión metálico -- que se ensaya.

La calefacción exactamente igual a 30° durante cuatro horas, así como las operaciones posteriores a la hidrólisis.

Se ensayan los modelos o-aminobenzóico, p-aminobenzóico, W-aminoacetofenona, ácido nicotínico y benzil-carbimil.

Los aminoácidos utilizados son: glicocola, alanina, lisina, cisteína, y ácido aspártico. Los metales en solución N/20 son: magnesio, cinc, níquel y el calcio en algunos casos.-

Los resultados de la hidrólisis se esquematizan en la tabla VII.

De ellos se deduce:

1a). En el caso del modelo p-aminobenzóico hay, en general, disminución del valor correspondiente a la actividad del modelo solo, aunque se eleva el correspondiente al modelo-aminoácido en ausencia de metales. El valor correspondiente al conjunto modelo-cisteína-Zn está en consonancia con el también elevado porcentaje obtenido en ensayos anteriores para el conjunto cisteína-Zn.

2a). En el caso del e-aminobenzóico hay siempre disminución con relación al fósforo liberado independientemente por el modelo y salvo en el caso de la glicocola, que permanece --prácticamente constante, hay disminución también con relación al sistema aminoácido-modelo.

3a). Los valores correspondientes al conjunto aminoácido-metal son inferiores en todo momento al valor presentado por el modelo aislado y apenas presenta variación notable con relación al porcentaje de fósforo hidrolizado por el sistema aminoácido-modelo en ausencia de metal.

T A B L A VII

Modelo	Sin amino-ácido metal	Glucosa			Alanina			Lactosa			Glutamina			Aspartato		
		Sin H ₂ O	Mg	Zn	Sin H ₂ O	Mg	Zn	Sin H ₂ O	Mg	Zn	Sin H ₂ O	Mg	Zn	Sin H ₂ O	Mg	Zn
P-amino-benzilico	3,75	0,7	1,5	1,7	1,7		0,7	1,4	1,7	1,7	1,5	1,4	4,3	3,2	0,8	1,5
O-amino-benzilico	3,7	1,4	1,4	1,7	1,7		2,8	1,4	1,5	1,6	2,8	1,9			3,2	1,5
N-amino-benzilico	4,4						1,5	1,7	1,2	1,9	1,7	1,5	1,7	1,7		1,7
o-amino-benzilico	2,2						1,3	1,2	1,2	1,5	2,5	1,5	1,5	1,9	1,9	1,7
benzoinico	0,4						0,4	0,3	0	0,4	0,8	0,7	0,6	0,7	1,2	1,2

Con incubación como en el ensayo anterior.

49). Aunque en proporción pequeña también se encuentran disminuidos los porcentajes del ácido nicotínico-aminoácido por la presencia de metales; ya anteriormente el aminoácido había disminuido la acción independiente del modelo. Únicamente hay una elevación algo apreciable en el sistema modelo-cisteína-Zn, de acuerdo con incrementos análogos observados anteriormente y con la elevación propia del sistema cisteína-Zn aislado.

50). En el caso del benzil-carbinol, la presencia de metales ocasiona, sobre todo en el caso de empleo de Zn, disminución de la actividad con relación al sistema modelo-aminoácido que como se recordará resultó asimismo débilmente incrementada con relación a la acción independiente del modelo aislado. El ácido aspártico, que presenta tanto aislado como unido al benzil-carbinol acción relativamente enérgica sobre el substrate, es, por tanto, el que ofrece cifras de fósforo hidrolizado más elevadas; también el Zn en este caso hace descender notablemente el porcentaje.

CONCLUSIONES

- 1º.- Se ha comprobado la actividad de preparados de fosfatasa renal sobre substratos de glicerofosfato sódico, estudiando sus variaciones, en función de pH, y concentraciones de aquel y de la enzima.
- 2º.- De todos los iones metálicos ensayados ejercen variación notable en la actividad de la fosfatasa, magnesio, cinc y níquel. El magnesio incrementa el porcentaje de P hidrolizado en toda la escala de pH. El cinc y el níquel inactivan asimismo en igual extensión.
- 3º.- La influencia del magnesio sobre la actividad de la fosfatasa se ejerce en distinto grado según la concentración del ión metálico, llegando a inhibición parcial cuando ésta es elevada.
- 4º.- Comparando la acción de la fosfatasa renal sobre substratos de glicerofosfato sódico y de aminofosfenato de dibencilo, se encuentra que posee una actividad mucho menor como amidasa que como esterasa.
- 5º.- La actividad que la fosfatasa ejerce sobre un substra-

te fosfamidico no experimenta variación apreciable al pasar del pH neutro a ácido o alcalino. Las variaciones en función de la concentración de la enzima o el substrate siguen la relación general.

- 69.- Haciendo intervenir los iones metálicos, cinc, níquel, magnesio y calcio a pH ácido, neutro y alcalino sobre un substrate fosfamidico en presencia de fosfatasa renal, no existe variación alguna apreciable en su actividad.
- 70.- Los aminoácidos alanina y lisina no ejercen influencia alguna sobre la actividad de la fosfatasa renal a concentración $N/2$ y $N/20$. La cisteina a ambas concentraciones es causa de inactivación manifiesta.
- 80.- El cinc y el níquel, actuando sobre la fosfatasa renal en presencia de los aminoácidos glicocola, alanina y lisina siguen inactivando la fosfatasa, aunque en menor grado que cuando éstos están ausentes. La influencia que ejerce el magnesio sobre la actividad de la fosfatasa renal en presencia de aminoácidos depende de la concentración de éstos; a concentración $N/2$ no hay variación sensible ocasionada por la presencia de magnesio.
- 90.- Los aminoácidos, por sí mismos, favorecen la hidrólisis

sis del glicerofosfato sódico, alcanzando su mayor porcentaje en el caso del ácido aspártico.

10a.-Los iones metálicos adicionados a los aminoácidos que actúan independientemente sobre el sustrato ocasionan disminución de su actividad, excepto el Ni y Zn que en presencia de cisteína eleva el porcentaje de P hidrolizado.

11a.-Los aminoácidos ocasionan, generalmente, disminución del porcentaje de fósforo liberado por los modelos de fosfatasa.

12a.-Por regla general, la adición de metales al sistema modelo-aminoácido es causa de disminución de la cantidad de P hidrolizada. Las elevaciones que se presentan en los casos del conjunto modelo-cisteína-cinc están de acuerdo con la elevación propia del sistema cisteína-cinc aislado.

3.- DIALISIS DE LA FOSFATASA RENAL.

- PARTE TEORICA -

Albers y colaboradores en 1938 (1) obtienen por diálisis prolongada de fosfatasa renal una fosfatasa inactiva, y atribuyen esta inactivación a la escisión de la enzima en un apoenzima protéico inactivo y un grupo prostético dializable. Estos autores demuestran que este coenzima no puede ser magnesio sino que se trata de una sustancia orgánica ligbil que puede ser obtenida incubando el holofermento a 100° durante unos minutos en medio neutro, tratamiento que destruye el apoenzima sin que la coenzima resulte afectada. Mezclando este último con un preparado de fosfatasa parcialmente inactivado por diálisis o por incubación en medio ácido, se obtienen soluciones activas de fosfatasa.

Albers realiza pruebas de estabilización de fosfatasa renal y afirma que en dominios fuertes de pH (2,95) la inactivación es irreversible y a menor acidez es reversible llevándola a pH 9 durante igual tiempo. La inactivación pudiera ser ocasionada por una transformación en metaproteína, pero por la curva parece tratarse de una disociación



(1).- B. 71, 1913, 1938.

que comprobaría la naturaleza compuesta de la fosfatasa renal; la inactivación y la activación con el pH son como la disociación y la asociación del fermento, excluyendo su curso lento el carácter salino de la unión que pudiera ser éster o amida hidrolizable.

En 1939, Albers (1) combinando el líquido dializable con la solución de proteína inactivada por diálisis de fosfatasa renal y adicionando magnesio pretende haber logrado una reactivación del 100 %.

Von Euler y Hahn (2) inactivan la fosfatasa renal por diálisis a pH 4,5 y anotan reactivaciones parciales por adición de solución de enzima a ebullición. En la ebullición de la solución del fermento a distintos pH se destruye el apofermento y la cofosfatasa permanece. Mezclando ésta con el apofermento se encuentra que cuando la ebullición se hace a pH 3 hay impedimento incluso sobre la solución de fosfatasa misma.

Cleotens (3, 4, 5), repitiendo las experiencias de Albers, llega a la conclusión de que la acción activante de -

(1).- Hoppe-Seyl. Z. 261, 43, 269, 1939.

(2).- Experientia, 3, 412, 1947.

(3).- Biochem. Z. 308, 57, 1941.

(4).- Biochem. Z. 310, 42, 1941.

(5).- Arch. int. Pharmacodyn. 68, 419, 1942.

una solución de enzima calentada o del líquido de diálisis no es debida a la presencia de una cofosfatasa sino más probablemente al ión cinc o cobalto que existe en muy pequeña cantidad y que forma complejo disociable.

Beche opina que la fosfatasa debe considerarse como una enzima de metal disociable (la mayor parte magnesio y a veces cinc) cuya actividad no está unida a la presencia de un metal más que en la medida que éste es un elemento de estructura del complejo orgánico portador del grupo activo, siendo también posible que no encierre coenzima disociable y que la actividad enzimática esté unida a la coordinación en un complejo metálico de diversos radicales de la apoenzima.

Theal (1) en 1947 comprueba que la diálisis prolongada a 37° es causa de inactivación de la fosfatasa intestinal, la cual puede reactivarse por incubación con aminocidos en medio alcalino determinando la medida de la actividad enzimática en presencia de ciertos iones inorgánicos y afirma que el grupo prostético dializable pudiera ser una combinación de un metal con un compuesto conteniendo grupo amino-ácido.

Por su parte Abul-Fadl y King (2) intentan aclarar la

(1).- Biochim. Biophys. Acta. 1, 61, 1947.

(2).- Biochem. J. 44, 435, 1949.

naturaleza del factor dializable sin lograr ningun resultado apreciable.

Por nuestra parte realizamos una serie de experiencias de diálisis con el fin, por un lado de lograr separar el apoenzima, con el que unido a los modelos de fosfatasa hacer ensayos de actividad enzimática, y de otro conseguir datos acerca de la naturaleza del posible cofermento que nos darían luz en la estructuración de nuevas moléculas con acción catalítica sobre los ésteres fosfóricos.

La fosfatasa la sometemos a diálisis prolongada tanto en medio neutro como en medio clorhídrico 0,1 N; los ensayos realizados en medio acuoso son de dos tipos: diálisis sencilla y electrodiálisis.

La actividad de la fosfatasa sometida a diálisis sencilla disminuye notablemente y cuando se trata de electrodiálisis, la enzima, que emigra constantemente hacia el cátodo y llega a recubrir por completo la membrana correspondiente, se ha inactivado totalmente aun cuando los ensayos de acción enzimática se realicen en toda la escala de pH y en presencia de los iones cinc, níquel y magnesio.

Por lo que se refiere a la constancia de los elementos metálicos durante la electrodiálisis acuosa, se observa que la fosfatasa dialisada no deja apenas cenizas al incinerar mientras que en el residuo a sequedad de las aguas de diálisis, el análisis espectral pone de manifiesto la existencia

abundante de magnesio, zinc, calcio, hierro, sodio y potasio. Juntamente con esta parte mineral, existe en el dializado suceso una porción nitrogenada de color marrón, soluble en agua. Coincidente con la desaparición casi total del contenido mineral en la fosfatasa dializada, relacionado con su manifiesta inactivación, se observa un aumento en el contenido en nitrógeno comparado con el de la fosfatasa sin dialisar.

La electrodiálisis en medio ácido de la fosfatasa renal se realiza disolviéndola en ácido clorhídrico N/10 y sometiendo el conjunto a una diálisis prolongada, en el transcurso de la cual se va depositando en la membrana catódica un sólido blanco de aspecto protéico siendo el porcentaje de su contenido nitrogenado del orden 20-21.

Esta "proteína" de fosfatasa es totalmente insoluble en soluciones diluidas de ácidos y álcalis, cloruro cálcico, sulfato amónico y alcohol absoluto, e incubada con los modelos de fosfatasa *m*- y *p*-aminobenzóicos, benzoin-carbínol, *w*-aminoacetofenona, ácido nicotínico y nicotamida no presenta actividad enzimática alguna apreciable sobre un sustrato de glicerofosfato cálcico. Cuando al conjunto anterior se añade la presencia de iones metálicos, los débiles valores anteriores de *P* hidrolizada se encuentran nuevamente disminuidos salvo en el caso de la *w*-amino-acetofenona en que se produce un pequeño aumento.

Las aguas clorhídricas procedentes de la electrodiálisis evaporadas al baño maría y finalmente al vacío, originan un sólido que al incinerar deja abundante residuo mineral - cuyo análisis espectral pone de manifiesto todos y cada uno de los componentes metálicos que se encuentran en la fosfatasa renal: magnesio, cinc, níquel, calcio, hierro, sodio y potasio, alguno de los cuales quedaren previamente demostrados por investigación directa en el sólido total de evaporación, en el que queda asimismo establecida la presencia de fósforo y nitrógeno. El contenido en nitrógeno de este sólido total, débilmente amarillo-casba y muy higroscópico, es 5,2 %, que se eleva a 10,7 % cuando se ha separado de él la porción mineral existente.

Esta parte mineral que se va depositando lentamente en la disolución acuosa del sólido total, puede separarse de él por tratamiento con alcohol absoluto, resultando de un lado un sólido blanco, insoluble, pulverulento, nada higroscópico, y una disolución alcohólica débilmente colorada que da lugar a un sólido bien cristalizado con un 10,7 %-11 % de nitrógeno y sumamente higroscópico.

La parte mineral da cualitativamente reacción positiva intensa de PO_4 y analizado de modo cuantitativo, tanto colorimétrica como gravimétricamente arroja un 24,1 % de fósforo, siendo 24 % el porcentaje que corresponde a un fosfato de fórmula PO_4HMt_{11} ($Mt_{11} = 30$), destacando que el análisis

espectral de sus cenizas demuestra la existencia de cinc, níquel, hierro, calcio y sodio y a lo sumo indicios de magnesio, pero nunca en las proporciones en que se encontraba en las cenizas obtenidas del sólido total de evaporación.

La solución alcohólica que lleva el compuesto nitrogenado da por evaporación unos cristales bien formados, muy higroscópicos que no poseen punto de fusión definido sino que a 110-120° se reblandecen, seguida de una intensa carbonización, y que tienen un contenido en N de 11,08, 10,4, -- 10,7 %; cristales que asimismo dejan residuo metálico en el que se identifica la presencia del magnesio.

Se han realizado varios espectros de absorción sin que de su estudio puedan concluirse afirmaciones sobre la naturaleza de este compuesto nitrogenado; asimismo da lugar a derivados de precipitación con molibdato amónico y ácido pícrico, el primero blanco que no funde a 350° y en forma de agujas amarillentas el segundo con punto de fusión 180° d.

Alrededor de estos grandes cristales se observan esporádicamente unos cristalitos más pequeños en forma de agujas con un porcentaje en nitrógeno de 23,5 %.

Cuando a este sólido se le trata con ácido clorhídrico a ebullición se obtiene una solución, que previamente neutralizada, da débiles reacciones de pentenas y notables de furfurel principalmente con acetato de anilina, reacción -- que se presenta aun con mayor intensidad en el destilado --

que resulta después de tratar con ácido clorhídrico concentrado la fosfatasa misma. Se intenta definir la estructura de la pentosa existente formando la osazona correspondiente, no lográndose más que un enturbiamiento con el que no se puede operar para la medida de sus constantes físicas; pero en la actualidad se prepara su caracterización por cromatografía.

Una vez hecho el tratamiento con ácido clorhídrico, como se expone anteriormente, ya no da lugar a los derivados con molibdato amónico y ácido pícrico que se formaban antes de hidrolizar y se encuentra de nuevo fósforo entre los productos de hidrólisis.

Existen en la bibliografía de los nucleósidos y nucleótidos una serie de datos y hechos experimentales que muestran analogías y concordancias con los resultados comprobados por nosotros en las anteriores experiencias.

Las formas cristalinas de nucleósidos y nucleótidos suelen pertenecer a sistemas inferiores y sus puntos de fusión son muy semejantes; así la uridina, $C_9H_{12}O_6N_2$, cristaliza en agujas de alcohol diluido que funden a 165° (1) la citidina, $C_9H_{13}O_5N_3$, forma agujas que se reblandecen a 220°

Todos los nucleósidos y nucleótidos de que se hacen mención están referidos a la ribosa.

(1).- Levenne y Jacobs. B. 43, 3159.

y descomponen a 230° (1); la inosina, $C_{10}H_{12}O_5N_4$, cristaliza sin agua de alcohol a 80° dando agujas que se descomponen a 215° (2); la adenosina, $C_{10}H_{13}O_4N_5$, unida a $1\frac{1}{2}$ moléculas de agua, que pierde en el vacío a 110°, y con calefacción rápida funden las agujas formadas a 229° (3); la xantósina, $C_{10}H_{12}O_6N_4$, forma grandes prismas con 2 H_2O , carbonizándose al calentar sin que funda (4); la guanósina, $C_{10}H_{15}O_5N_5$, cristaliza en forma de agujas o prismas, con dos moléculas de agua, que pierde en el vacío a 110° (5), descomponiéndose al calentar rápidamente a 237°.

El ácido uracílico cristaliza de alcohol formando prismas que se descomponen a 202° (6); el ácido citidílico forma esfenoides monoclinicos (7) de agua, que se descomponen a 227° (8) y prismas de alcohol al 50 % que se descomponen

-
- (1).- Levenne y Laforge, B. 45, 612.
(2).- Kaiser y Wenzel, Monatshefte f. Chem. 29, 168.
(3).- Levenne y Jacobs, B. 42, 2705.
(4).- Levenne y Jacobs, B. 43, 3163.
(5).- Levenne y Jacobs, B. 42, 2472.
(6).- Levenne, J. Biol. Chem. 40, 397.
(7).- Groth, B. 51, 463; Hoppe-Seyl. 104, 69.
(8).- Thannhauser y Dorfmueller, Hoppe-Seyl. 104, 71.

a 230-233° (1); el ácido inosínico es un jarabe que se solidifica por tratamiento con alcohol; el ácido guanílico cristaliza en prismas con dos moléculas de agua (2), que pierde a 118° y presión ordinaria, la cual vuelve a tomar de nuevo a la temperatura ambiente, fundiendo la sustancia seca a -175°, y descomponiéndose a 180° (3).

Los nucleósidos anteriores son higroscópicos y en su totalidad completamente solubles en agua y más o menos insolubles en alcohol absoluto; los nucleósidos correspondientes son asimismo solubles en agua.

Calentando estos compuestos con ácido oxalídrico (d = 1.06) y destilando dan productos de descomposición; así la uridina (4), citidina (5) y guanosina (6) producen furfural en estas condiciones. La guanosina da con fteroglucina y ClH coloración roja (7). La xantosina con orcina en medio ácido mineral da coloración verde (8).

(1).- Levenne, J. Biol. Chem. 41, 484, 1920.

(2).- Buell y Perkins, J. Biol. Chem. 72, 25, 1927.

(3).- Levenne, J. Biol. Chem. 41, 485, 1920.

(4).- Levenne y La Forge, B. 45, 608.

(5).- Levenne y La Forge. B. 45, 612.

(6).- E. Schulze, Hoppe-Seyl. 66, 130.

(7).- E. Schulze y Cartoro, Hoppe-Seyl. 41, 462; 66, 133.

(8).- Rptw. Bd. XXVI. Pág. 447.

Los nucleótidos forman sales con diversos cationes y bases orgánicas, higroscópicas y que a veces contienen grandes cantidades de agua; así un preparado seco de la sal monosódica del ácido guanílico, $\text{NaC}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_8\text{N}_5\text{P}$, lleva un 14,4% (1) y la disódica, $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_5\text{P}$, un 21,1%. Los puntos de fusión de estas sales no suelen ser claros y se reblandecen a temperaturas inferiores a la de fusión, a la que frecuentemente se descomponen.

A su vez dan los nucleósidos sales con otros ácidos, como el ácido pícrico, entre las que se encuentran los diacrilatos de citidina, p.f. 185-187° (d) (2); de adenosina, p.f. 180-185° según Levenne y Jacobs (3) y a 195-198° según Gulland y Holiday (4); de guanosina, p.f. 190° (5) en forma de agujas amarillas.

El ácido guanílico precipita de sus soluciones acuosas por adición de los ácidos fosfowolfrámico y pícrico (6) y al tratarlo con ácidos se rompe con mucha mayor facilidad por la unión guanflica que por la del fosfórico, resultando un ácido ribofosfórico que no se rompe con facilidad por --

(1).- Feulgen, Hoppe-Seyl. 106, 256.

(2).- Levenne y Jacobs, B. 43, 3154.

(3).- B. 42, 2704.

(4).- J.Chem. Soc. 769, 1936.

(5).- E. Schulze y Boschard, Hoppe-Seyl. 66, 133.

(6).- Bang, Hoppe-Seyl, 26, 139.

los ácidos (1) y es difícilmente soluble en agua.

Al comparar estos datos con los de muestras experimentales, nos creemos autorizados a establecer haciéndose así por primera vez la probable naturaleza nucleotídica de la "fosfatasa" prosiguiendo los trabajos para la determinación de la estructura del compuesto nitrogenado y de la pentosa, así como de los aminoácidos correspondientes de la "proteína" separada en la electrodiálisis clorhídrica.

Se han realizado por último una serie de experiencias de copulación de la "proteína" separada de la fosfatasa en una operación llevada a cabo a baja temperatura y el sólido del que se separó la parte mineral. Desde luego, la unión de estos componentes de la fosfatasa no restablece actividad alguna, siendo de tener presente la escisión que en el compuesto separado en la diálisis ha tenido lugar y la posible alteración de la "proteína" por el pH del medio.

(1).- Levenne y Jacobs, B. 41, 2706; 44, 749.

PORTE EXPERIMENTAL

1a).- DIALISIS EN MEDIO ACUOSO DE LA FOSFATASA RENAL

Se hacen primeramente una serie de ensayos previos de diálisis acuosa sencilla durante setenta y dos horas; después se utiliza en la práctica de la diálisis de la fosfatasa renal un electrodializador "Selutren".

En la célula central de la cubeta de diálisis ponemos una cantidad variable de fosfatasa -0,5 grs.; 1,8 grs.; 3,7 grs.; 3 grs.- en agua destilada; la fosfatasa no se disuelve en ella pero se logra tener en todo momento una suspensión homogénea con la agitación mecánica del aparato. Aparentemente no se observa cambio alguno en el aspecto de la fosfatasa, así como tampoco en el agua que la contiene.

La intensidad de la corriente que circula es pequeña por la escasa conductividad de la solución y se mantiene un voltaje de 300 V durante unas veinte horas. A pesar de la agitación y en el transcurso de la diálisis, la fosfatasa - el una emigración progresiva se deposita completamente en la membrana correspondiente al cátodo.

Al terminar la diálisis centrifugamos el contenido de

la célula central y la fosfatasa dializada la lavamos con alcohol y éter anhidro, conservándose en desecador de vacío; el aspecto de la fosfatasa así dializada es algo distinto del que poseía con anterioridad a la electrodiálisis, ahora es más esponjosa, el débil color que antes poseía es mucho más tenue y aparentemente es de bastante menor densidad.

Utilizando esta fosfatasa dializada se hacen una serie de ensayos:

A). Actividad enzimática comparada con la acción que posee idéntica fosfatasa sin ser sometida a la diálisis acuosa.

- a).- Actividad de la fosfatasa renal después de diálisis acuosa: Su variación con el pH.
- b).- Variación de la actividad de la fosfatasa renal dializada por incubación durante doce horas con Zn^{++} : influencia del pH.
- c).- Variación de la actividad de la fosfatasa renal dializada por incubación durante doce horas con Mg^{++} : influencia del pH.
- d).- Variación de la actividad de la fosfatasa renal dializada durante doce horas incubada con Hg^{++} : influencia del pH.

Se hace actuar la fosfatasa sobre un substrate de gli-

cerofosfato sódico N/20 tamponado, según el pH a que se expone, con acetato-veronal, manteniendo el conjunto durante una hora, a 37-38° con arreglo al siguiente esquema:

Fosfatasa de diálisis acuosa sencilla

	I	II
Glicerofosfato N/20	5 cc.	5 cc.
Tampón pH 9,16	5 cc.	5 cc.
Fosfatasa	1 ctgr. dializada	1 ctgr. sin dializar
Agua dest.	2,5 cc.	2,5 cc.

Fosfatasa de electrodiálisis acuosa

(a)

	I	II	III	IV	V
Substrato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tampón pH ..	5,32	6,99	8,55	9,16	9,64
Fosfatasa dializada	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.	1 ctgr.
Agua dest.	2,5 cc.	2,5 cc.	2,5 cc.	2,5 cc.	2,5 cc.

(b)

	I	II	III	IV
Substrato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tam- pón pH ...	5,32	6,99	9,16	9,64
Fosfatasa dializada	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.
2,5 cc...	Zn ⁺⁺ N/20	Zn ⁺⁺ N/20	Zn ⁺⁺ N/20	Zn ⁺⁺ N/20

(c)

	I	II	III	IV
Substrato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tam- pon pH ...	5,32	6,99	9,16	9,64
Fosfatasa dializada	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.
2,5 cc.	Ni ⁺⁺ N/20	Ni ⁺⁺ N/20	Ni ⁺⁺ N/20	Ni ⁺⁺ N/20

(d)

	I	II	III	IV
Substrato	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
5 cc. tam- pón pH ...	5,32	6,99	9,16	9,64
Fosfatasa dializada	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.	1 ctg.
2,5 cc.	Mg ⁺⁺ N/20	Mg ⁺⁺ N/20	Mg ⁺⁺ N/20	Mg ⁺⁺ N/20

Cuando intervienen los iones metálicos han sido incubados a la temperatura ambiente durante doce horas con la fosfatasa-dializada.

Cada uno de éstos ensayados anteriormente reseñados, tiene el correspondiente utilizando fosfatasa renal sin dializar.

Una vez que ha terminado la calefacción, se introducen los tubos de ensayo en hielo para suspender la acción de la enzima y del conjunto bien homogeneizado se toma 1 cc. al que se añaden 8,5 cc. de agua destilada y 0,5 cc. de ácido tricloroacético. Se filtra y del filtrado se toman 5 cc. que se diluyen hasta siete con agua destilada, se añaden los 5 cc. correspondientes de molibdato amónico al 5% en $\text{SO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$, hidroquinona al 1% y sulfito sódico al 20% y se valora colorimétricamente el fósforo liberado a los treinta minutos de la adición de los reactivos en colorímetro fotoeléctrico.

Los resultados obtenidos son:

Fosfatasa de diálisis sencilla

	<u>mgts. P/cc.</u>	<u>% P</u>
I	0,069	4,4
II	0,8620	60,5

Fosfatasa de electrodiálisis acuosa.

pH	5,32	6,99	8,55	9,16	9,64
Sin incubación ...	0%	0%	0%	0%	0%
Incubación con Zn.	0%	0%		0%	0%
Incubación con Ni.	0%	0%		0%	0%
Incubación con Mg.	0%	0%		0%	0%

Testigos correspondientes de fosfatasa sin dializar:

pH	6,99	9,16	9,64
Sin metal ...	33,8 %	60,5 %	53,8 %
Con Zn	5,8	14,1	13,4
Con Ni	8,3	12,9	12,1
Con Mg	50,2	80,1	78

De todo ello se deduce que al someter la fosfatasa a una - diálisis acuosa en las condiciones anteriormente citadas - disminuye muy notablemente su actividad cuando se trata de diálisis sencilla y la pierde totalmente en toda la escala de pH en caso de electrodiálisis, no observándose asimismo indicio alguno en el pH óptimo alcalino.

La fosfatasa dializada no recupera tampoco actividad

alguna incubándola previamente durante doce horas con los iones Zn^{++} , Ki^{++} y Mg^{++} .

B). Incineración de la fosfatasa dializada.

Con objeto de realizar un análisis espectral en las cenizas de la fosfatasa electrodiálizada en solución acuosa, persiguiendo la investigación de la constancia de los elementos metálicos puestos de manifiesto en las cenizas de la fosfatasa renal, se disponen en un crisol de platino 0,2 grs. de fosfatasa dializada que al incinerar desaparecen de tal modo que no queda más que un granito rojizo que imposibilita el ejecutar con elle análisis alguno. Utilizando idéntica cantidad de fosfatasa se obtienen al incinerar abundantes cenizas con las que se realizó la investigación de los constituyentes metálicos.

C). Contenido nitrogenado.

Se compara en este ensayo el contenido en nitrógeno de ambas fosfatasas dializada y sin dializar:

% N fosfatasa sin dializar ...	16,5; 16,08
% N fosfatasa dializada	19,54; 20,01

Puede apreciarse un aumento notable en el contenido en nitrógeno ocurrido durante la diálisis; ha sido separado, por tanto, de la fosfatasa algún cuerpo que no contiene nitrógeno.

ne. Con este hecho experimental coinciden la ausencia de enzimas en la fosfatasa dialisada y su inactividad absoluta como enzima.

Las aguas de la electrodiálisis acuosa se concentran por evaporación al baño maría apareciendo el líquido débilmente coloreado a medida que ésta progresa; cuando la concentración es tal que quedan unos 100 cc. se continúa al vacío apareciendo, al final en el matraz de destilación un residuo blanco (R) fuertemente adherido a las paredes y unas gotas amarillentas que se disuelven bien en agua y por evaporación total dan un sólido de color marrón; el residuo blanco anterior R se disuelve en agua con bastante dificultad, la que se favorece con la adición de unas gotas de ácido clorhídrico diluido.

El residuo blanco R, que quedaba adherido a las paredes del matraz da N negativo y de su aspecto en la fusión con sodio parece se trata exclusivamente de combinaciones metálicas ya que no se carboniza y da una masa blanca muy higroscópica. Este mismo sólido blanco, así como su solución clorhídrica dan con molibdato amónico en medio nítrico reacción claramente positiva de fósforo.

El sólido de color marrón se disuelve bien en agua pero la disolución no es estable sino que se forman progresi-

vamente precipitados; dicha substancia dá N positivo y en cambio investigada la presencia de fósforo en su solución acuosa con molibdato en medio nítrico da resultado negativo. Tanto la solución acuosa como una solución clorhídrica de esta sustancia calentada a reflujo durante treinta minutos no presentan poder reductor alguno frente al licor de Fehling; así como tampoco cuidadosamente tratada esta fracción nitrogenada con nitrito sódico y ácido clorhídrico experimentan reacciones que hubiesen puesto de manifiesto la presencia de grupos $-NH_2$ aromáticos.

Con objeto de realizar un estudio de los elementos metálicos separados de la fosfatasa en la electrodiálisis -- acuosa mediante análisis espectral, evaporamos totalmente a sequedad las aguas de diálisis al baño maría en recipientes adecuados, obteniéndose asimismo un residuo como compuesto de dos partes: una completamente blanca de aspecto cristalino en el fondo y otra de color marrón que forma como estratos en el recipiente. Cantidad de residuo: De -- 0,7210 gra. de fosfatasa se obtienen 0,0784 gra. de residuo total.

Una parte de este residuo total le incineramos en crisol de platino dando abundantes cenizas blancas con las que se realiza un espectrograma con arreglo al siguiente esquema:

Elec. base	Tala dre	Contenido	Amp.	V	Exp.	Observ.
Fe	--	-----	--	--	25 s.	Orient.
Cu	1½	Cenizas problema	3,75	32,5	3 m.	Análisis
Cu	1½	Id. id.	--	--	--	Id.
Cu		----	--	--	--	Orient.
--	2	OZn (e.p.) (Zn)	--	--	2 m.	"
--	--	SO ₄ Ni (e.p.) (Ni)	--	--	--	"
--	--	SO ₄ Mg (e.p.) (Mg)	--	--	--	"
--	--	CO ₃ Ca (e.p.) (Ca)	--	--	--	"
--	--	Al ₂ O ₃ (e.p.) (Al)	--	--	--	"

poniendo de manifiesto su estudio la presencia abundante de magnesia, así como en menores proporciones la existencia de cinc, calcio, hierro e indicios de sodio y potasio. Como ya de observarse todos los elementos metálicos cuya presencia - fué demostrada en las cenizas de fosfatasa renal, a excepción del níquel, se encuentran presentes en las cenizas obtenidas en la incineración del residuo total de evaporación de las - aguas de diálisis procedentes de una electrodiálisis acuosa.

La abundante presencia del magnesio separado de la molécula en condiciones suaves parece estar relacionado con la - pérdida total de la actividad de la fosfatasa dializada, la elevación en el porcentaje de nitrógeno y la ausencia casi -

absoluta en ella de residuo mineral.

DIALISIS ACUOSA

	Residuo total	Sólido R	Sólido coloreado
Aspecto	Fácilmente observables sus dos componentes	Blanco-cristalino	Amorfo; marrón
N	Positivo	Negativo	Positivo
P	Positivo	Positivo	Negativo
Componentes minerales	Mg, Zn, Ca, Fe, Na y K		

2a), DIALISIS CLORHÍDRICA DE LA FOSFATASA RENAL

Una cantidad variable de fosfatasa renal -0,83; 1,93; 2,0 y 3,84 gra.- se añaden a 500 cc. de ácido clorhídrico N/10 en un Erlenmeyer, se agita de vez en cuando energicamente y se deja estar durante la noche; se obtiene de este modo una disolución coloidal, habiendo desaparecido completamente toda la fosfatasa, débilmente coloreada.

Esta disolución no se consigue obtener siempre tan homogénea y algunas veces flota en su superficie una sustancia de aspecto gelatinoso.

En la célula central de la cubeta de diálisis del electrodiálizador se pone la disolución de la fosfatasa completando su volumen con agua destilada; con agitación simultánea

nea se hace pasar lentamente una corriente de agua destilada por ambas células anódica y catódica sin que tenga lugar paso alguno de corriente ya que al principio la excesiva -- conductividad de la solución perjudicaría el régimen del -- aparato por sobrepasar la intensidad inicial los 0,6 amp. - que es el límite máximo tolerado en un funcionamiento ideal del electrodiálizador utilizado.

Cuando la concentración iónica del líquido ha disminuído de modo que la intensidad de la corriente es inferior a 0,6 amp. se dá comienzo a la electrodiálisis, controlada su marcha por el indicador de la conductividad; al principio - el voltaje es pequeño y va aumentando poco a poco hasta 300 V con una intensidad de corriente muy pequeña, siendo necesarias unas cuarenta a cincuenta horas en régimen de funcionamiento para lograr una diálisis completa que ha de interrumpirse periódicamente para evitar un calentamiento excesivo del sistema.

La disolución de fosfatasa, que al principio es homogénea y algo coloreada, comienza en seguida a enturbiarse y volverse más opalescente; al proseguir la diálisis se va depositando en la membrana catódica, a pesar de la agitación, un sólido de aspecto totalmente protéico, blanco, a medida que va aclarándose el líquido que termina por estar totalmente transparente.

Ha de hacerse notar una correspondencia entre el depó

sito total de la fosfatasa en la membrana del cátodo y ésta electroforesis simultánea de la proteína hacia dicha misma membrana.

Al dar por terminada la electrodiálisis tenemos, por tanto, en la célula central un líquido completamente transparente e incoloro con una sustancia protéica adherida a -- una de las membranas; y una abundante cantidad de aguas electrolíticas de diálisis con las que operaremos subsiguientemente. Este líquido transparente e incoloro no precipita con los reactivos: ácido tricloroacético, alcohol absoluto, cloruro sódico al 8%, sulfato amónico a media saturación y sulfato amónico en disolución saturada; tampoco se experimenta cambio alguno por calefacción al baño maría de dicho líquido; todo ello pone de manifiesto la no existencia en disolución de algún resto de proteína.

Bien directamente de la membrana donde se deposita o bien centrifugando todo el conjunto, logramos separar la "proteína" de fosfatasa renal.

"Proteína" de fosfatasa renal.

La proteína separada como anteriormente se indica, se lava bien con agua destilada en la que es completamente insoluble, y se determina su contenido en nitrógeno previamente secada a 60° hasta constancia de peso:

N% proteína 20,45 ; 21,1

En la práctica de la electrodiálisis se puso de manifiesto que frecuentemente la disolución de la fosfatasa renal no era completa en ácido clorhídrico N/10 y que en la superficie flotaba algunas veces una sustancia de aspecto gelatinoso; el análisis del contenido en nitrógeno de este sólido previamente desecado es: N%: 21,79; como puede observarse del mismo tipo que el anotado para la proteína separada en la diálisis pero lógicamente algo superior por no haber sido sometido aún el conjunto a la electrodiálisis y separada la porción no nitrogenada.

La proteína de fosfatasa renal es completamente insoluble en agua, siéndolo también en disoluciones de ácidos y álcalis diluidos, en solución de cloruro sódico al 8%, en alcohol de 96° y en sulfato amónico en solución semisaturada. Dicha "proteína" es fácilmente dispersable en agua y con esta suspensión se realizan los ensayos de copulación con modelos de fosfatasa.

SOLIDO SEPARADO DE LAS AGUAS CLORHÍDRICAS DE LA ELECTRODIÁLISIS.

El arrastre de la sustancia dializable se realiza con agua destilada y las aguas clorhídricas recogidas, unos 20-25 litros, se evaporan al baño maría hasta que quedan unos 100 cc., que se presentan coloreados de amarillo claro, los

cuales se concentran al vacío hasta sequedad completa obteniéndose un sólido amarillento, sumamente higroscópico, perfectamente soluble en agua y observándose en él la presencia cualitativa de nitrógeno.

En los primeros intentos encaminados a obtener datos acerca de la composición del sólido, obtenido en la evaporación total, como anteriormente se ha indicado, de las aguas clorhídricas, disolvemos una pequeña parte en agua y con la solución acuosa I, débilmente colorada se realiza:

A.- Algunas reacciones de elementos metálicos:

a).- Con sulfocianuro potásico y ácido clorhídrico se produce una muy débil coloración motivada por la presencia de Hierro.

b).- Con fosfato disódico en presencia de amoníaco se forma con la solución I un abundante precipitado cristalino identificado como fosfato amónico magnésico que nos pone en evidencia la existencia de magnesio en dicho sólido de evaporación.

c).- Cuando la disolución I se trata con amoníaco se forma abundante precipitado parte del cual se redisuelve en cloruro amónico; en la disolución de este precipitado se forma asimismo un sólido blanco al tratar con ferrocianuro potásico, presencia de Zn, algo verdoso debido a la existen-

cia de Fe; en la misma disolución del precipitado anterior se produce una intensa coloración tratando con dimetilglioxima, presencia de níquel.

d).- Tratando la solución I con sosa al 30% aparece un precipitado anaranjado; agitando el conjunto con éter no logra extraerse ninguna sustancia que hubiera podido ponerse en libertad con el tratamiento alcalino.

e).- La disolución I con molibdato amónico en medio nítrico produce precipitado de fosfomolibdato amónico reducible posterior y fácilmente con estannite sódico, formándose la fuerte coloración azul del correspondiente azul de molibdeno. Presencia de fósforo.

B).- Esta disolución acuosa con la que se ha operado anteriormente no es perfectamente estable ya que en su seno va formándose progresivamente un sólido de color marrón y aspecto cristalino que no puede hacerse entrar en solución y que se forma mucho más rápidamente cuando la disolución acuosa recién preparada se enfría con mezcla frigorífica; de la misma manera el sólido total que en un momento dado se disuelve totalmente en agua, se evapora ésta, y después de cierto tiempo ya no se vuelve a disolver totalmente, quedando sin hacerle pequeñas fracciones bien cristalizadas.

Con este sólido que poco a poco va precipitando en -

la disolución acuosa I hacemos ensayo cualitativo de nitrógeno, resultando la prueba negativa; la masa de fusión con sodio es completamente blanca y muy higroscópica, tratándose seguramente de la precipitación espontánea de sales metálicas.

C).- En nuestra intención de obtener datos acerca de la estructura del compuesto nitrogenado presente en el residuo total se realiza con esta disolución I un espectro de absorción cuya gráfica se acompaña (gráfica 3) no observándose en ella máximos destacados que permitan una orientación de la posible naturaleza de dicho compuesto.

Otra pequeña parte del sólido total la empleamos en la determinación cuantitativa del contenido en nitrógeno del conjunto, previamente sometido a una prolongada desecación en vacío sobre KOH.

% N Sólido total 5,26 ; 5,12

y asimismo en la incineración para la obtención de cenizas con que realizar análisis espectral de los elementos metálicos separados de la fosfatasa renal en la electrodiálisis clorhídrica. El esquema del espectrograma es el siguiente - obtenido con dos muestras de cenizas procedente de dos ope-

razones de extracción y diálisis diferentes:

Elem. base	Taldro	Contenido	Amp.	V	Exp.	Observ.
Fe	--	-----	--	-	25 s.	Orient.
Cu	1½	Cenizas I	3,75	32,5	3 m.	Análisis
Cu	--	Cenizas II	"	"	"	Id.
Cu	--	-----	--	--	--	Orient.
--	--	OZn (e.p.) (Zn)	--	--	2 m.	Id.
--	--	SO ₄ Ni (e.p.) (Ni)	--	--	--	Id.
--	--	SO ₄ Mg (e.p.) (Mg)	--	--	--	Id.
--	--	CO ₃ Ca (e.p.) (Ca)	--	--	--	Id.
--	--	Al ₂ O ₃ (e.p.) (Al)	--	--	--	Id.

Del estudio del espectrograma se deduce una gran riqueza en Magnesio de las cenizas, así como la presencia de hierro, calcio, hierro, sodio y potasio.

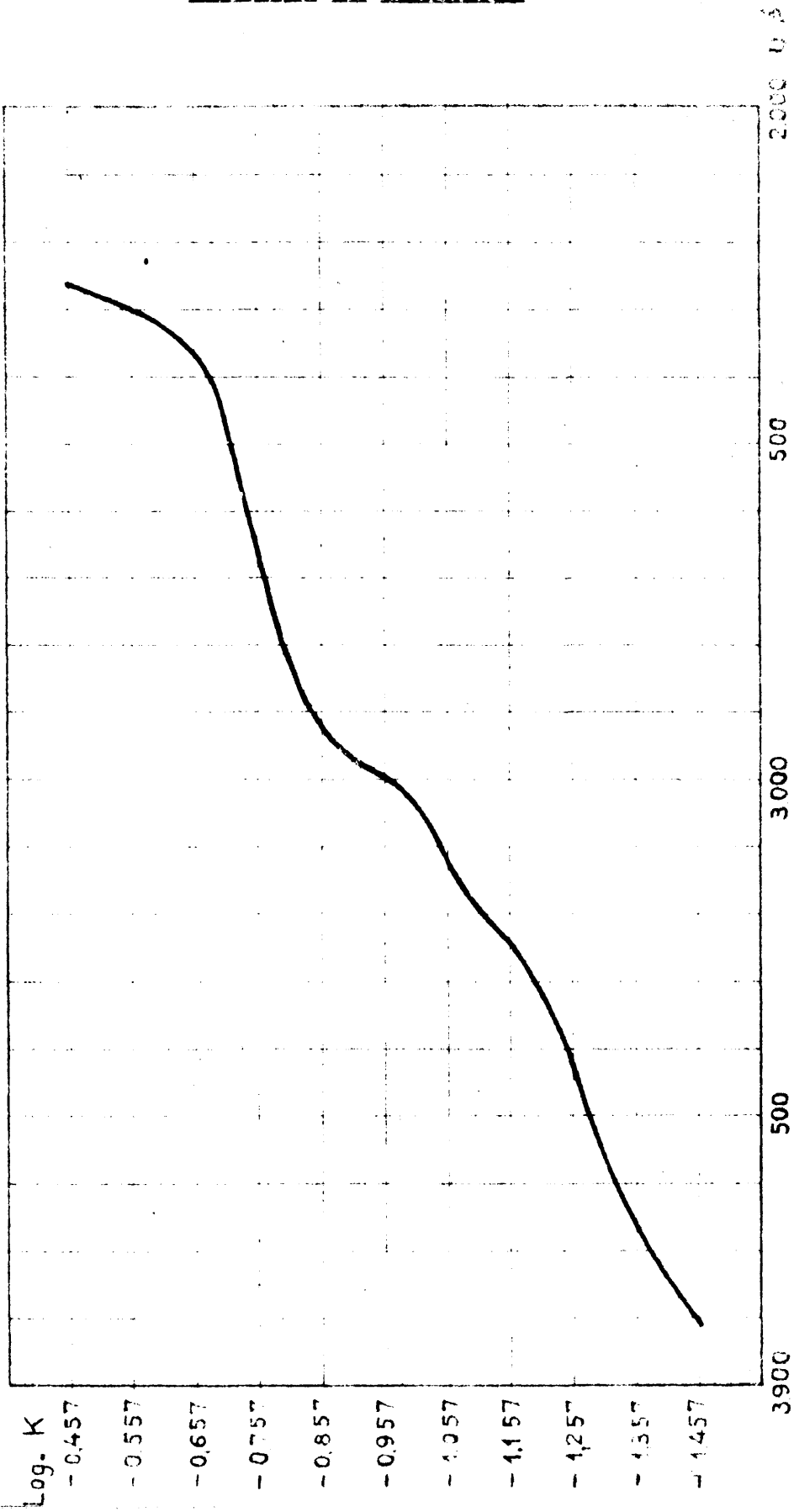
Se ve, pues, que en el sólido total obtenido de las aguas de diálisis existe una parte mineral y un componente nitrogenado, siendo además de destacar la notable presencia de fósforo en el conjunto.

SEPARACION DEL COMPONENTE MINERAL

A lograr la separación de ambas fracciones, mineral y nitrogenada, van encaminados los ensayos siguientes.

Cuando la disolución total acuosa se trata con alcohol

GRAFICO No 3
ESPECTRO DE ABSORCION



de 96% se forma un abundante precipitado quedando la disolución con el mismo color que poseía. Este precipitado formado le separamos del conjunto por centrifugación, se lava -- con alcohol y se seca en desecador de vacío; se trata de un sólido blanco pulverulento, nada higroscópico que ensayado cualitativamente demuestra no poseer nitrógeno; no posee poder reductor alguno frente al licor de Fehling ni aún después de haberse calentado a reflujo previamente con sosa e ácido clorhídrico; disuelto en ácido nítrico diluido da reacción positiva muy abundante de fósforo con molibdato amónico.

Para la separación de esta parte mineral es mucho mejor que tratar la solución acuosa del residuo total de evaporación de las aguas clorhídricas de la electrodiálisis -- ácida con alcohol de 96%, sobre todo cuando en dicha solución acuosa no ha tenido lugar la precipitación espontánea de parte mineral, hacerle directamente con alcohol absoluto sobre el mismo residuo ya que de este modo es mucho más eficiente la separación.

La determinación cuantitativa del fósforo de este componente mineral se realiza colorimétrica y gravimétricamente.

a).- Determinación colorimétrica: 0,0040 grs. del sólido blanco conteniendo fósforo se disuelven totalmente en 5 cc. de una mezcla de 4 cc. de agua destilada y 1 cc. de

ácido sulfúrico diluido. De los 5 cc. tomamos 2 ó 1 cc. completando hasta los 7 cc. con agua destilada y añadiendo los 3 cc. correspondientes de la colorimetría del fósforo

	<u>T^a</u>	<u>Ext.</u>	<u>ext. P/cc.</u>
Tomando 2 cc.	24	0,620	0,0043
" 1 cc.	50	0,205	0,0021

Como en el segundo caso la dilución fué 1 : 50, corresponden a los 5 cc., o sea a los 0,0040 grs. de sólido utilizado, $50 \cdot 0,0021 = 0,0010$ grs. de fósforo.

Σ P 23

b).- Determinación gravimétrica: 0,1734 grs. de este sólido blanco se atacan fácilmente con mezcla sulfúrica, se diluye, neutraliza con amoníaco y añade mixtura magnésica y amoníaco conforme a la técnica gravimétrica de valoración de fósforo. Peso del precipitado obtenido 0,0417 grs.

Σ P 24,1

El contenido en fósforo de un compuesto que tuviese de fórmula $O = P \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown O \\ \diagdown OH \end{matrix}$ 30 correspondiente a un fosfato dibásico cuyo átomo de metal bivalente tiene un peso atómico medio de 30 es 24 %.

Luego podemos concluir que, probablemente, este cuerpo que se precipita con alcohol de la solución acuosa del reactivo

due total de las aguas de la electrodiálisis clorhídrica, es una mezcla de distintos fosfatos metálicos.

Análisis de las cenizas.- Una pequeña fracción de este sólido se incinera en crisol de platino obteniendo, sin carbonizarse, abundantes cenizas completamente rojas, fotografando de su espectro con arreglo al siguiente esquema:

Elec. base	Taladro	Contenido	Amp.	V	Ext.	Observ.
Fe	--	-----	--	--	1,5 m.	Orient.
Cu	1	Cenizas problema	3,5	32,5	3 m.	Análisis
--	2	Id. id.	--	--	--	Id.
--	3	Ca_2Ca (e.p.)	--	--	2 m.	Orient.
--	--	Al_2O_3 (e.p.)	--	--	--	--
--	--	Zn (e.p.)	--	--	--	--
--	--	SO_4Mg (e.p.)	--	--	--	--
--	--	$\text{Cr}_2\text{O}_7\text{Na}_2$ (e.p.)	--	--	--	--
Cu	--	-----	--	--	--	--

Del estudio del espectrograma se deduce la existencia en las cenizas de hierro, calcio, sodio, potasio y níquel; la existencia del magnesio podría ser calificada a lo sumo como de indicios pero nunca en las proporciones en que se encontraba en las cenizas obtenidas a partir del sólido total de evaporación.

Se realiza nuevo espectrograma comparando los dos tipos de cenizas: a), las obtenidas del residuo total de diálisis y b), las cenizas rojas del sólido separado por precipitación con alcohol de la disolución acuosa; nos detenemos únicamente en el estudio del magnesio:

Elec. base	Talg. dre	Contenido	Amp.	V	Exp.	Observ.
Fe	--	-----	--	--	25 s.	Orient.
Cu	1½	Cenizas a	3,75	32,5	3 m	Anal. Mg
--	--	Id. b	--	--	--	Id.
--	2½	80 Mg	--	--	2 m	Orient.
Cu	--	-----	--	--	--	Id.

De él se deduce que únicamente existe magnesio en las cenizas totales y no aparece en las procedentes del sólido precipitado. Hay que hacer notar que la precipitación con alcohol se ha hecho en este caso inmediatamente de preparar la disolución acuosa y sin dar lugar a precipitaciones en el seno de la misma.

ESTUDIOS ACERCA DEL COMPUESTO NITROGENADO

Caracteres físicos, riqueza en N, reacciones etc... Cuando de la solución acuosa de la sustancia total obtenida de las

aguas de la electrodiálisis clorhídrica se ha separado un cuerpo sólido por separación espontánea y posterior tratamiento con alcohol del 96% e mejor aún, como se ha dicho anteriormente después de tratar dicha sustancia total con alcohol absoluto, queda un líquido alcohólico de color caoba que al dejar evaporar en un vidrio de reloj da lugar a un sólido coloreado S, cristalizado como puede observarse en las fotografías adjuntas y cuyo análisis cuantitativo de nitrógeno da:

% N 11,08; 10,40; 10,70

datos de análisis de operaciones distintas.

Aunque desde un principio se vislumbra una estructura cristalina sin embargo, no se logra la aparición de estos cristales mientras no ha tenido lugar una separación eficaz de los fosfatos minerales. Al separar la fracción mineral ha aumentado el porcentaje en nitrógeno un 5,82 %; este sólido se extiende más sobre plato poroso, en él le dejamos secar durante cuatro días y efectuado un punto de fusión se observa alrededor de 110-120° como un reblandecimiento y al seguir calentando una intensa carbonización de la sustancia.

Al evaporar en vidrio de reloj una mayor cantidad de la solución alcohólica anterior obtenemos de la misma manera la sustancia bien cristalizada en el centro del vidrio y a todo su alrededor sembrado de pequeñas agujas que al agitar

merarse presentan débil color. Secada una parte de ellas sobre plato poroso se observa al hacer un punto de fusión un cambio completo de aspecto a 120-122°; verificado análisis de nitrógeno con estas pequeñas agujas se obtiene un valor:

% N 23,55

Con este sólido S se hacen reacciones de aminas primarias en general y de aminas primarias aromáticas resultando ambas -- pruebas negativas. Al tratar con NaOH la disolución de la -- sustancia en la reacción de la carbilamina aparece una intensa coloración naranja.

En la extracción con éter subsiguiente al tratamiento alcalino de la disolución acuosa del sólido S no se logra separar sustancia alguna.

Espectro de absorción.- En una disolución alcohólica al 1/100 del sólido cristalizado obtenido por separación de la parte mineral se realiza su espectro de absorción cuya gráfica se acompaña (gráfica nº 4) y que es de igual aspecto que la nº 3 realizada con anterioridad a la separación de la parte mineral.

Presencia de sustancias reductoras.- Una disolución acuosa del sólido S no presenta poder reductor alguno frente al licor de Fehling.

Hidrólisis ácida del compuesto nitrogenado.- Para investi-

MICROFOTOGRAFIAS DEL SOLIDO S

que la...
microfotografía...
de un...
presente...
tiene...
previsto...
en...
de...
reacción...
para...
proceso...
mejora...
la...
riesgo...
el...
de...
de...
de...

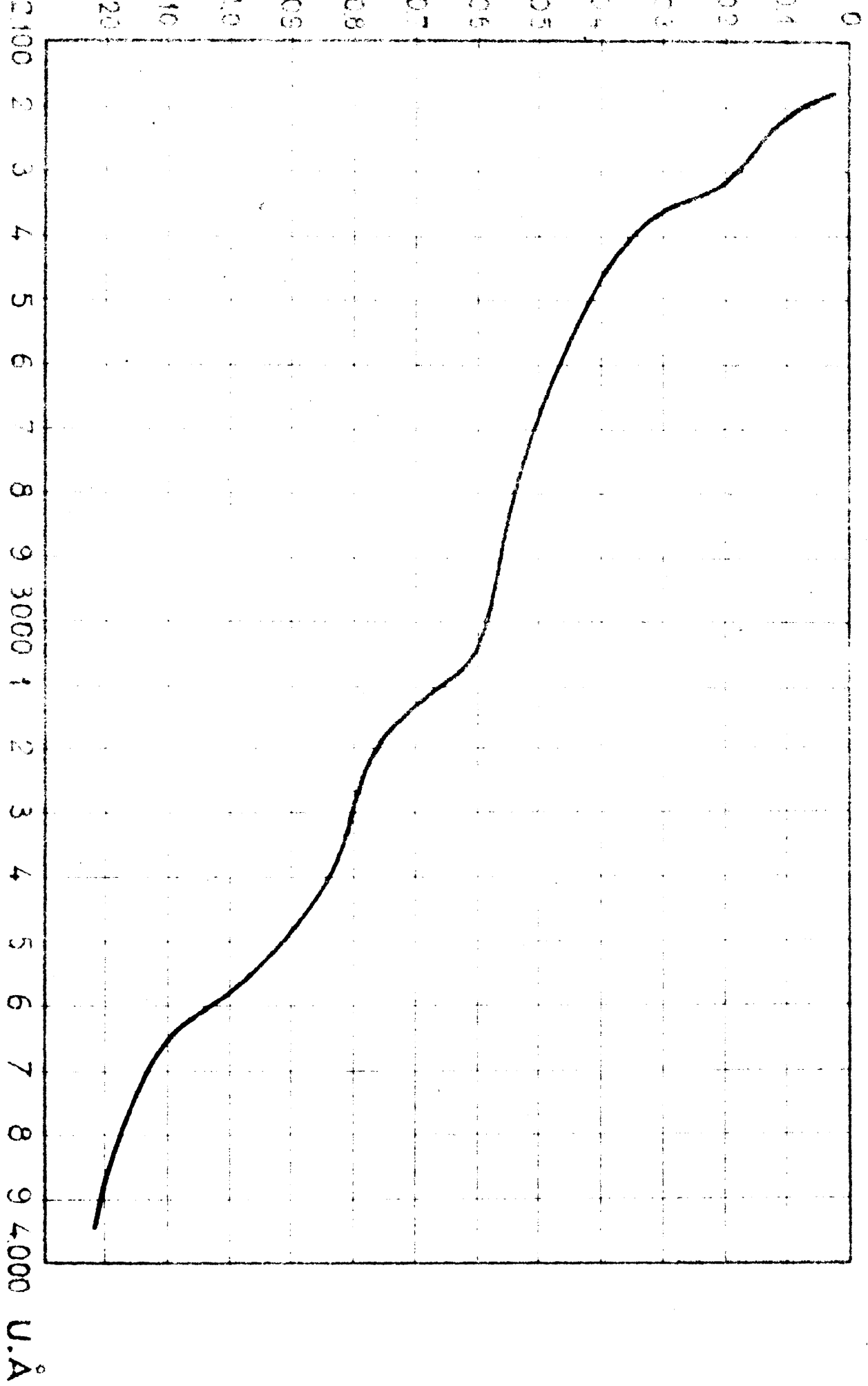


gar la liberación de sustancias reductoras del sólido 8 por hidrólisis ácida, calentamos a reflujo 0,2 gra. con 8 cc. de ácido clorhídrico 6 N en aparato de ajuste esmerilado durante tres horas; en este tratamiento, la solución, que al principio es débilmente colorada, se oscurece notablemente. Previamente neutralizada la solución clorhídrica y observado su poder reductor frente al licor de Fehling, si bien no presenta la reducción típica de dicho reactivo, sin embargo tiene lugar, prolongando la calefacción, la formación de un precipitado color arena que no se transforma subsiguientemente en el óxido de cobre rojo.

El mismo ensayo de hidrólisis en medio alcalino con NaOH 6 N no conduce a una prueba más evidente del poder reductor.

Con la solución clorhídrica de hidrólisis se ensayan reacciones de hexosas y pentosas con resorcina y orcina-cigruro férrico respectivamente. En el primero de los casos se produce con resorcina a ebullición una coloración rojo anaranjada (reacción característica de las hexosas); calentada la solución clorhídrica con orcina y una gota de cloruro férrico se produce una débil coloración verdosa (la coloración verde es característica de las pentosas).

Tomando 4 cc. de la misma disolución clorhídrica de hidrólisis neutralizada, intentamos preparar la osazona añadiendo 0,4 gra. de clorhidrato de fenil-hidrasina y 0,6 gra.



Exposico de abstraccao - Grafica nr 4.

de acetato sódico, disponiéndose el correspondiente testigo de agua destilada. Al cabo de unos 20-30 minutos se produce en el tubo problema un enturbiamiento sin que tenga lugar la formación intensa de precipitado y sin que pueda recristalizarse debidamente para la ejecución de sus constantes físicas.

El sólido obtenido por evaporación a sequedad de la disolución clorhídrica de hidrólisis del sólido S α con acetato de anilina coloración roja, no muy intensa, idéntica a la ocasionada por una disolución muy diluida de FURFUROL.

Conviene en este punto hacer las siguientes consideraciones:

1º). El furfural α con resorcina una reacción análoga a la que presentan las hexonas y que fué observada por nosotros -- anteriormente.

2º). El furfural procede del tratamiento clorhídrico de pagtonas, hecho que puede relacionarse con la débil coloración que se producía en la reacción arcina-cloruro férrico..

3º). Como hemos comprobado experimentalmente una disolución de xilosa a una concentración muy pequeña y aproximadamente igual a la hipotética que podía obtenerse en nuestra hidrólisis clorhídrica no tiene influencia alguna reductora sobre el licor de Fehling.

Hidrólisis clorhídrica de la fosfatasa renal.- En un matras de ajuste esmerilado calentamos a reflujó en baño de aceite 0,4 grs. de fosfatasa en 20 cc; de ácido clorhídrico 6 N durante cuatro horas, al cabo de las cuales destilamos el conjunto y a una muestra del líquido recogido añadimos unas gotas de anilina y ClH concentrado apareciendo coloración roja intensa característica del furfurel. Una porción de la solución clorhídrica de hidrólisis, previamente neutralizada, de la fosfatasa tampoco presenta poder reductor frente al licor de Fehling.

Hidrólisis sulfúrica de la fosfatasa renal.- 0,4 grs. de fosfatasa se calientan a reflujó en matras de ajuste esmerilado con 20 cc. de ácido sulfúrico al 2%; con muestras previamente neutralizadas ensayamos su poder reductor frente al licor de Fehling al cabo de una, dos, cuatro y ocho horas de calefacción, siendo la prueba negativa en todos los casos.

Derivados de precipitación con molibdato amónico y ácido nítrico.- Una muestra de la disolución acuosa del sólido S se trata con una solución acuosa al 10% de molibdato amónico formándose un abundante precipitado de color blanco. Se recoge el precipitado, se lava bien con agua, se seca y determina su punto de fusión. Punto de fusión: no se observa fusión ni cambio alguno a los 350°.

Unos centímetros cúbicos de una disolución alcohólica del sólido S se tratan con 1 cc. de una disolución también alcohólica de ácido pícrico, formándose un intenso enturbiamiento blanco-amarillento que se disuelve en exceso de alcohol; esta turbidez se deposita en el fondo del tubo de ensayo, se recoge por decantación y se lava varias veces con agua, se seca y observa el punto de fusión, P.f. 180° con descomposición.

PRESENCIA DE FOSFORO

Análisis cualitativo de fósforo en la fosfatasa renal

a). 0,2 grs. de fosfatasa se añaden a 10 cc. de agua destilada; se agita durante unos minutos, se filtra y se investiga en el filtrado la presencia de fósforo con los reactivos de la colorimetría, resultando el ensayo completamente negativo.

b). 0,2 grs. de fosfatasa se añaden a 10 cc. de ácido clorhídrico 0,1 N -idéntica concentración a la empleada en la diálisis ácida-; se agita como en el caso anterior, se filtra y se investiga de la misma manera la presencia de fósforo en el filtrado resultando la prueba igualmente negativa.

Análisis de fósforo en el compuesto nitrogenado.

El sólido S disuelto en agua destilada no da directamente con molibdato amónico ningún precipitado que indique presencia de fósforo. Una pequeña porción del sólido S disuelto en agua destilada se hierve unos minutos con ácido nítrico diluido y en estas condiciones se obtiene con molibdato amónico un abundante precipitado amarillo que demuestra la presencia de fósforo.

Hidrólisis clorhídrica.- 0,8 grs. del sólido S se calientan a reflujo con ClH (1 : 1) durante ocho horas incrementándose notablemente el color de la disolución. Una muestra de esta disolución, previamente neutralizada, produce al ser calentada en medio nítrico con molibdato amónico el precipitado característico debido a la presencia de fósforo.

Asimismo cuando en la disolución obtenida en los anteriores ensayos de hidrólisis clorhídrica del compuesto nitrogenado se trata con ácido nítrico en caliente para hacer desaparecer la acción inhibitoria que posee el ClH sobre el ensayo del fósforo, y luego se ensaya la presencia de fósforo, el resultado es positivo.

La disolución clorhídrica obtenida se destila al vacío a sequedad completa y el sólido obtenido se trata con agua destilada quedando una pequeña porción insoluble en ella la que cualitativamente ensayado posee nitrógeno; la solución

acuosa se evapora a sequedad y el residuo total tratado con alcohol absoluto deja una parte sin disolver II que dá reac-
ción de fósforo y deja una solución alcohólica que evapora-
da a sequedad dá un sólido nitrogenado cuyo análisis cuanti-
tativo dá:

N % 10,70

El residuo total de evaporación de la disolución clor-
hídrica de hidrólisis deja al incinerarse residuo blanqueci-
no escaso.

Lo anteriormente expuesto se resume en el esquema si-
guiente.

Derivados de precipitación de los productos de hidrólisis.

La disolución acuosa del residuo total obtenido en la
hidrólisis clorhídrica del sólido S tratada con las solucio-
nes de molibdato amónico y ácido pterico según se expuso an-
teriormente no produce precipitado ni enturbiamiento alguno.

Pequeña porción insoluble I
nitrogeno positivo.

<u>Sólido S</u>	<u>CH</u>	<u>Reaf</u>	<u>Agua</u>	
	dest. duo			porción
Soluble	en agua			II, insoluble P.
Id.	en alce- hol			
		Disol. acuosa	<u>evap</u>	<u>Reaf</u>
			duo	<u>al-</u> <u>cehol</u>
				Soluc. alcohólica

Sólido
N°...10,7

COPULACION DE LA PROTEINA DE FOSFATASA RENAL CON EL SOLIDO S
AISLADO EN LA ELECTRODIALISIS CLORHIDRICA

Electrodialisis clorhídrica a baja temperatura.

La operación de diálisis se dispone en cámara frigorífica mantenida constantemente a 2-3° con arreglo a las características ya señaladas en la electrodialisis clorhídrica - a temperatura ambiente. Exactamente igual que en aquella la proteína formada emigra y se va depositando progresivamente en la membrana del cátodo en forma de una capa sumamente blanca.

La proteína se recoge por centrifugación del conjunto de la célula central de la cubeta de diálisis y se conserva a 0° hasta el momento de su utilización. En este ensayo a baja temperatura se obtiene una cantidad de sólido S arras-

trade por las aguas de diálisis menor de la que era de esparrar, teniendo en cuenta la cantidad de fosfatasa utilizada, referida a la de ensayos a temperatura ambiente.

Ensayos de copulación.

Se prepara una suspensión homogénea de la proteína en agua destilada que contiene 0,010 grs. de N en cada centímetro cúbico.

0,035 grs. de sólido S se disuelven en 6 cc. de agua, - solución para ser utilizada juntamente con la anterior suspensión en los ensayos de copulación.

Como sustrato se utiliza disolución N/20 de glicerofosfato sódico en el mismo tampón de acetato-veronal a pH 9,16, óptimo de la fosfatasa, que también se emplea como testigo. El conjunto se calienta durante una hora a 40° con arreglo - al siguiente dispositivo:

	I	II	III
Solución de glicerofosfato-tampón	4 cc.	4 cc.	4 cc. H ₂ O
Fosfatasa	0,005 grs.	0,005 grs.	0,005 grs.
Agua	4 cc.	4 cc.	4 cc.
	4 cc. H ₂ O	2 cc. H ₂ O - 2 cc. N/20	4 cc. H ₂ O

	IV	V	VI
Glicerofosfato-tampón	4 cc.	4 cc.	4 cc. H ₂ O
Proteína ..	4 cc. 4 cc. H ₂ O	4 cc. 2 cc. H ₂ O-2 cc. Mg N/20	4 cc. 4 cc. H ₂ O

	VII	VIII	IX
Glicerofosfato-tampón	4 cc.	4 cc.	4 cc. H ₂ O
Proteína ..	4 cc. 2 cc. H ₂ O- 2 cc. sol. S	4 cc. 2 cc. sol. S- 2 cc. Mg N/20	4 cc. 2 cc. H ₂ O- 2 cc. sol. S

Durante el curso de la calefacción se agita frecuentemente y al fin de ella se enfría con hielo el dispositivo de hidrólisis.

Del total de 12 cc. se toman 5 a los que se añaden 2,5 cc. de agua y 0,5 cc. de ácido tricloroacético al 20 %; se filtra y del filtrado se toman bien 5 cc. e 1 cc. que se diluyen hasta 7 cc. a los que son añadidos los 3 correspondientes de la colorimetría del fósforo.

La valoración arroja los siguientes resultados:

Testigos	Fosfatasa renal	60,2 %
	Fosfatasa renal con magnesio	83,7 %
	Acción de la "proteína" independientemente sobre el sustrato de glicerofosfato	0,09 %
	Acción de la "proteína" juntamente con el ión magnesio	0,10 %
	Copulación "proteína"-sólido S	0,13 %
	Copulación "proteína"-sólido S-ión Mg^{++} .	0,12 %
	Testigo "proteína"-sólido S sin sustrato	0,04 %

Se deduce de ello: 1ª), el hecho insistentemente repetido de la activación de la fosfatasa renal por el ión magnesio.

2ª), la "proteína" independientemente ejerce en estas condiciones experimentales una acción extraordinariamente débil, de la misma manera que unida al ión magnesio.

3ª), la unión "proteína"-sólido S no tiene mayor acción sobre el sustrato, así como la unión "proteína"-sólido S-ión magnesio, que la ofrecida por la "proteína", teniendo en cuenta la pequeña liberación de fósforo que tiene lugar a partir del sólido S.

C O N C L U S I O N E S

- 1ª).- La diálisis acuosa sencilla prolongada de la fosfatasa renal ocasiona descenso notable de su actividad enzimática.
- 2ª).- La electrodiálisis acuosa de la fosfatasa renal produce la inactivación total de la enzima.
- 3ª).- La incineración de la fosfatasa dializada en medio -- acuoso no deja residuo que permita su caracterización espectral.
- 4ª).- El contenido nitrogenado de la fosfatasa pasa de antes a después de la diálisis de un 16 % a un 20 %.
- 5ª).- El análisis espectral de las cenizas obtenidas del sólido total de evaporación de las aguas de la electrodiálisis acuosa pone de manifiesto la presencia abundante de magnesio, así como de cinc, calcio, hierro e indicios de sodio y potasio.
- 6ª).- En el residuo total de evaporación de las aguas de la electrodiálisis acuosa se observe la presencia de una sustancia de color marrón, que posee nitrógeno, el --

cual no se encuentra en forma de grupos $-NH_2$.

- 7^a).- La electrodialisis clorhídrica de la fosfatasa renal deposita en la membrana catódica una sustancia de aspecto totalmente protéico con un contenido en nitrógeno del 20,4-21 %.
- 8^a).- En las aguas clorhídricas de la electrodialisis se separa por evaporación un residuo en el que se demuestra:
- a).- Presencia de ión fosfórico y de N, éste en proporción de 5,2 %.
 - b).- Presencia en sus cenizas de Hg, como elemento más abundante, y además Zn, Ni, Ca, Fe, Na y K, es decir, toda la parte mineral del holofermento.
 - c).- Por tratamiento con alcohol, queda un residuo mineral insoluble que corresponde a la fórmula $PO_4^{II}HMt$, en el que el análisis espectral revela la presencia de todos los iones metálicos anteriores, excepto magnesio.
 - d).- De la solución alcohólica del tratamiento anterior, cristaliza un producto con un contenido en N del 11 %.
- 9^a).- En este producto nitrogenado se prueba:
- a).- Presencia de magnesio.

b).- Precipitaciones por molibdato amónico y por ácido pícrico (p.f. 180° d.), que después de hidrólisis clorhídrica ya no se producen.

c).- Presencia de pentosa y de ión fosfórico en sus productos de hidrólisis.

De todo ello, en principio puede deducirse el carácter de difosfonucleótido de la cofosfatasa renal, a precisar posteriormente en un más amplio estudio que se realiza.

10ª).- Se hacen ensayos de copulación con este sólido cristalino y "proteína" de fosfatasa obtenida en una operación de electrodiálisis clorhídrica a 20-30 sin que se produzca reactivación alguna, siendo de tener en cuenta para la interpretación procedente la ruptura del compuesto obtenido por evaporación de las aguas de diálisis y la probable inactivación de la "proteína" por el pH del medio.