JOSE GIRAL PEREIRA

Profesor Extraordinario del Instituto Politécnico. Antiguo Profesor de Química Biológica de la Universidad de Madrid

FERMENTOS

BIBLIOTECA DEL COLEGIO DE MEXICO

LA CASA DE ESPAÑA EN MEXICO

Primera edición española, 1940

Queda hecho el depósito que marca la ley
Copyright by *La Casa de España en México*

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

por

FONDO DE CULTURA ECONOMICA
Av. Madero, 32
1940

PROLOGO

El presente folleto comprende todo el contenido de la serie de conferencias que profesó su autor en la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional de México. Han sido ampliadas y revisadas con objeto de abarcar los últimos trabajos, aparecidos en las revistas especializadas en estos próximos pasados meses. La bibliografía, en efecto, alcanza hasta diciembre de 1939.

El propósito fundamental del autor es el de ofrecer al público culto de habla española un resumen moderno y actual de los múltiples problemas científicos y técnicos que se relacionan con los Fermentos.

Va dedicado, este librito, con preferencia, a Médicos, Farmacéuticos, Biólogos, Químicos e Industriales; y también a estudiantes aventajados de esas profesiones.

El simple enunciado de sus capítulos pone ya de manifiesto el interés de los temas que se tratan. Si el autor acertó a exponerlos con claridad, lo habrá de decir el lector; su deseo no fué otro.

Quiero expresar, una vez más, mi gratitud profunda a La Casa de España en México, *que patrocina y edita esta obra.*

José Giral

México, D. F., diciembre, 1939.

PARTE GENERAL

BOSQUEJO HISTORICO

La alteración profunda de la materia orgánica constitutiva de los seres vivos cuando éstos pierden su funcionalismo (su vida), es un fenómeno conocido desde los tiempos más remotos. Con el nombre específico de putrefacción se le distingue en los casos de materias animales y aun vegetales que originan, en el curso de dicha alteración, substancias repugnantes por su olor o por su aspecto. Es en definitiva el proceso previo a la mineralización de todo lo orgánico, restituyendo al medio lo que de él tomó en el ciclo bioquímico eterno de la materia; que las substancias minerales de la tierra se incorporan al vegetal y se convierten en la propia substancia de éste tomando aquí su origen la vida; y que las plantas sirven luego directa o indirectamente, para la alimentación animal, son hechos de observación y de experiencia; el animal y el vegetal cuando mueren reintegran a la tierra (desorganizándose y por tanto mineralizándose), lo que de ella tomaron primitivamente.

En estas fundamentales transformaciones materiales no se percibió agente alguno que las provocase ni que las determinase; se creyeron espontáneas y hubieron de pasar muchos siglos de conocidas para que se averiguasen las causas que lo originaban. Causas y orígenes diversos y en discusión, que fueron siguiendo a las teorías e hipótesis predominantes en el campo de la Química, en épocas sucesivas.

La primera transformación de esta clase, que fué conocida, observada y aplicada, es la del zumo de la uva madura (mosto) en vino; durante su transcurso, tiene lugar desprendimiento de gases (anhídrido carbónico) en el seno del líquido y el fenómeno tiene la apariencia externa de una ebullición; de la palabra latina *fervere* (hervir) vino la de Fermentación.

Esta producción de vino, conocida desde los tiempos bíblicos, no fué estudiada con criterio científico hasta 1648, año en que HELMONT lo hizo.

Un siglo después, el gran químico francés LAVOISIER, quiso explicar el fenómeno y sus similares, por la aplicación de la teoría química llamada del *flogisto*. Pero hasta la mitad del siglo pasado no adquirió importancia ni utilidad el estudio de las llamadas fermentaciones; era entonces la época en la cual PASTEUR hizo sus sensacionales descubrimientos de los microorganismos y fundó la Bacteriología, ciencia tan fecunda en provechosas enseñanzas. Este eximio investigador probó de modo irrefutable que todas las substancias orgánicas, aun las tenidas como más fácilmente alterables y putrescibles, se mantenían intactas e invariables si se colocaban en un medio ambiente absolutamente desprovisto de microbios, en tanto que la simple presencia de éstos determinaba la transformación rápida de aquellas substancias que aparentemente era considerada como espontánea.

La fermentación tipo, que antes hemos mencionado, era un simple acto vital de un microorganismo (el *Saccharomyces cerevisiæ*, un hongo microscópico) que se alimentaba del azúcar del mosto y que excretaba alcohol y ácido carbónico.

Bien pronto fué controvertida esta explicación por el gran químico alemán LIEBIG, el cual defendía que la fermentación no era más que un desdoblamiento molecular de la substancia fermentescible con el concurso del oxígeno del aire. La polémica entre PASTEUR y LIEBIG respectivos defensores de las teorías vitalista y mecánica de las Fermentaciones, constituye una de las páginas más brillantes e instructivas en la Historia de la Ciencia. La fermentación propiamente dicha es la obra química de la vida sin aire, afirmaba PASTEUR; el movimiento vital de los fermentos es un fenómeno mecánico, aseveraba LIEBIG; y es un caso de atavismo científico pretender explicar fenómenos químicos por acciones vitales cuando la ciencia aspira a explicar la vida misma por transformaciones químicas.

La controversia duró muchos años porque los contendientes habían hecho Escuela, eran tenaces y grandes investigadores.

Aunque los microbios son seres unicelulares, poseen una gran complejidad física y química; los investigadores pensaron que la acción fermentativa debiera vincularse a alguna parte solamente

de su organismo y descubrieron unas substancias, segregadas por ellos, que eran las determinantes de las fermentaciones; se llamaron entonces "fermentos solubles" para diferenciarlas de los "fermentos figurados" o microbios.

En los últimos años de la vida de PASTEUR, todavía defendió éste con tesón, que las fermentaciones producidas por los primeros debieron denominarse "falsas" quedando como "verdaderas" las producidas por microorganismos. BERTHELOT, el maestro de la Química Moderna, logró aislar a fines del pasado siglo, el primer fermento soluble, la *invertina,* capaz de desdoblar a la sacarosa por hidrolisis, en una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa; comenzaron entonces a denominarse estos fermentos solubles con el nombre genérico de *Diastasas,* y a la que nos ocupa se la llamó *Invertasa,* nombre que después se cambió por el de *Sacarasa* en atención a la substancia sobre la cual actúa.

No le fué posible a BERTHELOT, aunque puso en ello gran empeño, aislar la Diastasa de la fermentación alcohólica; lo consiguió BUCHNER en 1898, triturando con arena las células de la levadura de cerveza (el *saccharomyces cerevisiæ*) y filtrando el conjunto; así se obtuvo la *alcoholasa,* en el líquido filtrado y así, o de modo análogo, se consiguieron otras muchas. Actualmente se cuentan por muchas docenas, las conocidas, y de tal importancia que WILLSTAETTER, la máxima autoridad de la química contemporánea, ha llegado a decir que "La vida es un sistema de acciones diastásicas cooperantes". Ejemplo bien inmediato de ello tenemos en la alimentación; los cuerpos alimenticios que ingerimos, son después y sucesivamente digeridos, absorbidos y asimilados. La digestión a lo largo de nuestro aparato gastrointestinal, no es más que una serie de hidrolisis, de desdoblamientos, de análisis, de simplificaciones de los alimentos para transformarlos en productos sencillos solubles, fácilmente absorbibles y asimilables; los carbohidratos pasan a glucosa, las proteínas a amino-ácidos, las grasas se hidrolizan también (a la vez que se emulsionan); con todos estos elementos resultantes el propio organismo reconstruye su propia materia. Pero en todos estos procesos, analíticos y sintéticos, la presencia y acción de diversas Diastasas es absolutamente indispensable.

Las oxidaciones y reducciones intraorgánicas, la respiración, la formación de hormonas y todos los procesos de metabolismo requieren también la intervención activa de los fermentos.

BIBLIOTECA DEL COLEGIO DE

Pero los investigadores químicos no se dieron por conformes con el descubrimiento de las Diastasas e inquirieron inmediatamente su modo de actuar y las reacciones que provocaban en la substancia fermentescible o *substrato*; bien pronto apreciaron que esas reacciones eran de naturaleza química, medibles y sometidas a las leyes que rigen todas ellas: hidrolisis, oxidaciones, saponificaciones, desdoblamientos, transformaciones diversas; todos, procesos químicos conocidos de antiguo. Y hubieron de pensar, entonces, si la acción de las Diastasas podía suplirse por la de agentes químicos (orgánicos, inorgánicos, cuerpos compuestos, simples) que ejerciesen transformaciones idénticas.

Los hechos experimentales se pronunciaron por la afirmativa en muchos casos; la acción hidrolítica podían ejercerla los ácidos diluídos, la saponificante las bases, las oxidantes y reductoras diversos cuerpos o especies químicas. ¿Habría de conservarse para ellos el calificativo de Fermentos o Diastasas, desvirtuando el concepto genuinamente organizado o vital que se dió a estos agentes fermentativos? Así se hizo y actualmente se habla hasta de "Fermentos metálicos"; que son metales, cuerpos simples, elementos químicos en estado coloide y en un grado grande de dispersión micelar; se emplean en Terapéutica y pueden producir o favorecer las oxidaciones intraorgánicas.

Con esta evolución en el concepto de Fermento (ser vivo o microbio, Fermento soluble o diastasa, compuesto orgánico o inorgánico, cuerpo simple) es lógico que ni el razonamiento ni la imaginación se detengan. Pensando que estos agentes actúan en mínima cantidad y producen la transformación de enormes cantidades de substancias fermentescibles, se ha llegado a desmaterializar su papel y a considerarlos únicamente como transportadores o vehículos de energía capaz de destruir el edificio molecular del substrato. Ya no solamente se asevera, como lo hace BUNGE, que "una célula viva, una substancia orgánica o un metal actúan igualmente"; o se afirma, con ARTHUS, que el Fermento es un simple transportador y donador de ciertas substancias inorgánicas, que son las verdaderamente activas, sino que se establece el atrevido concepto del *"Fermento propiedad"* en oposición al clásico del *"Fermento-materia"*. El descubrimiento contemporáneo y actual de la estructura química de muchas Diastasas, ha hecho modificar estas ideas como veremos más adelante.

NOMENCLATURA

En el estado actual de nuestros conocimientos, se hace preciso una nomenclatura de las Diastasas o Fermentos que permita expresar en lengua castellana el concepto que se tiene de ellos.

Las definiciones del Diccionario de la Lengua no son exactas y es necesario modificarlas, rechazando además el empleo de palabras de ortografía extranjera y que inducen a confusión.

A instancias de un ilustre académico, he formulado algunas definiciones de estos cuerpos y de los análogos y derivados, las cuales han sido aceptadas por esa Corporación y figurarán en la nueva edición del Diccionario. Las actuales son las siguientes:

FERMENTO: Cuerpo orgánico que, puesto en contacto con otro, lo hace fermentar.

FERMENTAR: Transformarse o descomponer un cuerpo orgánico por la acción de otro que, puesto en contacto con él, aparece al final del proceso químico sin haberse modificado.

DIASTASA: (De diastasio, separación).—Fermento contenido en la cebada germinada, soluble en agua y cuya acción es sacarificar la fécula. Por ext. denomínanse hoy *diastasas* todos los fermentos naturales no organizados.

Pero adolecen de los siguientes defectos:

1º Las definiciones actuales son insuficientes y erróneas. Decir que fermento es cuerpo orgánico obliga a excluir a los fermentos metálicos (electrargol p. e.) que son inorgánicos, y a los microorganismos (levadura de cerveza p. e.) que son seres vivos o en estado de vida latente.

Decir que fermentar es transformarse o descomponerse, no es cierto porque algunas substancias al fermentar se recomponen y sintetizan en vez de descomponerse; la palabra transformar, ella sola, es suficiente y abarca todo el fenómeno.

Decir que diastasas son todos los fermentos naturales no organizados hace pensar que son los inorgánicos porque natural y no organizado no puede ser otra cosa. Quiere decir natural y no ser vivo o figurado. Es decir, amorfo o soluble.

2º Es necesario hacer figurar en la definición de fermentos sus características que son: Catalizador (cuerpo que actúa en mínimas

cantidades frente a otro; que se pone en contacto con este otro; que acelera su transformación la cual podría tener lugar sin su concurso pero mucho más lentamente; que aparentemente no se modifica y se encuentra íntegro al final del proceso químico porque se combina con la substancia que transforma pero luego se regenera). Amorfo o coloidal, ya sea un microorganismo o una substancia procedente de seres vegetales o animales. Actúa sobre substancias orgánicas *precisamente*, porque no hay fermentación de inorgánicas. Su acción es específica (para cada substancia fermentescible, un fermento que penetra en ella como la llave en la cerradura según el símil de FISCHER). Es reversible; el mismo fermento ejerce la acción contraria y por su acción se regenera el cuerpo primitivo a partir de los productos de la transformación.

3º Conveniencia de aprovechar otras definiciones del Diccionario que están bien para referirse a ellas. P. e. Catalizador.

4º Conveniencia de tomar la palabra *fermento* como la fundamental por ser la más antigua, la más española y la más usada. Ampliarla a las clases diversas de fermentos (figurados, amorfos, solubles, metálicos).

5º Referir a la palabra Fermento las otras sinónimas suyas. Pero solamente tres: Enzima, Cimasa, Diastasa. Especificando su empleo más corriente.

6º Rechazar aquellas palabras de ortografía demasiado extranjera y cuya admisión no haría más que confundir lo conceptos claros que deben expresar las anteriores. Tales son: Encima (para diferenciar del adverbio). Encyma, Enzyma, Cymasa, Zymasa, Zimasa.

7º Añadir aquellas otras palabras que expresan variantes de la noción de fermento: Cimógeno, Profermento, Cofermento, Cocimasa, Antifermento, etc.

Por lo cual han sido propuestas las siguientes:

FERMENTO: Cuerpo que actúa en pequeñas cantidades, como catalizador, sobre ciertas substancias orgánicas acelerando su transformación química. En general su acción es específica y reversible.

Fermento AMORFO: 1ª Dícese, en oposición al figurado, del fermento que no es microorganismo.—2ª Fermento soluble.

Fermento FIGURADO: Microorganismo que actúa como fermento.

Fermento METALICO: Metal en estado de disolución coloidal, que actúa como fermento.

Fermento SOLUBLE: Cuerpo orgánico, de procedencia vegetal o animal, amorfo y soluble en agua, que actúa como fermento.

FERMENTACIÓN: Transformación química de un cuerpo orgánico que se acelera por la acción de pequeña cantidad de otro, llamado fermento, el cual se pone en contacto con él y aparentemente no se modifica.

ENZIMA: Véase fermento soluble.

CIMASA: Véase fermento soluble. Dícese preferentemente de los que determinan fermentaciones alcohólicas.

DIASTASAS: Véase fermento soluble. Dícese preferentemente del que está contenido en la cebada germinada y cuya acción es sacarificar las féculas.

CIMÓGENO: Véase Profermento. Substancia precursora o generadora del fermento.

COFERMENTO: Véase Cocimasa. — Coencima. — Substancia que coadyuva y contribuye a la acción del fermento.

ANTIFERMENTO: Véase Anticimasa. — Antienzima. — Antidiastasa.—Substancia que impide o dificulta la acción del fermento.

La "Union Innternationale de la Chimie" viene ocupándose de la nomenclatura de las Diastasas.

La Comisón de Nomenclaturas de Química Biológica, a la cual pertenezco desde hace más de doce años, propuso en su reunión de Varsovia en 1927, la terminación *asa* para los nombres de todos estos cuerpos, a los cuales se les llama genéricamente *Diastasas* o *Encimas.*

En el Congreso de Lucerna (1936) se establecieron unas bases provisionales que pueden considerarse como definitivas después de la aprobación unánime en la reunión de Roma (1938). Son las siguientes: El prefijo de la palabra cuya terminación es siempre *asa* debe expresar de preferencia la naturaleza del substrato atacado (*peptidasa* p. e.) el modo de acción de la distasa (*dehidrogenasa*

p. e.) o una combinación de los dos conceptos anteriores (*sucinalde hidrogenasa* p. e.) El nombre *Encima* designa la totalidad del complejo activo, comprendiendo el soporte y los activadores; si es necesario distinguir entre la Encima considerada en su conjunto y la Encima privada de sus actividades, a la primera se le llamará *Holoencima* y a la segunda *Apoencima.* Las *Co-encimas* serán designadas por el nombre de la Encima activada precedido del prefijo. *Co* (*Coglioxilasa* p. e.)

Para subvenir a otras necesidades, no estudiadas aunque sí previstas por la Comisión Internacional, indicaremos algunas otras designaciones en los lugares oportunos de estas páginas.

MECANISMO DE SU ACCION

La definición de las *Diastasas* o *Fermentos* como agentes catalíticos es aceptada universalmente.

Un catalizador es, según la definición del gran químico alemán OSTWALD, un acelerador o un retardador de la velocidad de una reacción la cual tiene siempre lugar sin la presencia del catalizador, pero con velocidad mucho menor o mayor.

No es, por tanto, el catalizador un agente de presencia, un testigo de la reacción que no interviene ni material ni enérgicamente en ella, como se creía antes apoyándase en el hecho de que siempre se encuentra íntegro al final de la reacción, sino un cuerpo activo que se combina con el substrato y luego se regenera.

Pero no es suficiente su calidad de catalizador para definir un fermento; es necesario, además, que sea soluble, orgánico, coloide y producido por un organismo vivo (HALDANE, OPPENHEIMER, THOMAS): En efecto, se producen y existen en el interior de las células, tanto vegetales como animales; a veces no se manifiestan más que en ciertas condiciones y pueden pasar desapercibidos con frecuencia; y otras permanecen fuertemente unidos al protoplasma sin que salgan al exterior de la célula revelándose únicamente después de la destrucción de ella. WILLSTAETTER llama *Desmoencimas* a estos fermentos y reserva el nombre de *Lioencimas* a todos los que se encuentran libres y disueltos en las secreciones celulares y el de *Endo-encimas* a los disueltos que no pueden extraerse más que después de destruirse o autolizarse las células, aún a pesar de encontrarse libres en el interior de ellas.

La naturaleza coloide del Fermento es generalmente reconocida pero también se admite en muchos de ellos su condición de electrólito; ya la obtención de Diastasas cristalizadas hace sospechar esto último. Los estudios modernos acerca de la constitución química de muchas de ellas, han probado que están formados por proteídos, de los cuales se ha podido aislar el grupo prostético, absolutamente electrolítico, y proteína completamente coloide; pudiera por tanto, decirse de los Fermentos que son electrólitos coloidales.

El supuesto coloide se apoya en los caracteres especiales de ese estado de la materia y que tienen todas las Diastasas; no atraviesan las membranas semipermeables o lo hacen con extraordinaria dificultad; manifiestan el efecto TYNDALL cuando sus disoluciones son atravesadas por haz de rayos luminosos; tienen un peso molecular elevadísimo; no manifiestan apenas presión osmótica (oncótica en estos casos); y ofrecen, en general, todas las llamadas propiedades de superficie, entre las cuales se destaca la de adsorción; los fermentos son adsorbibles y adsorbidos; esta última condición ha permitido purificarlos y concentrarlos como veremos más adelante.

Pero la diastasa es por naturaleza soluble y funciona evidentemente como un electrólito débil; su actividad depende fundamentalmente del valor de P_H del medio en que actúa; este valor es distinto según la Diastasa de que se trate; las curvas de acidez de un Fermento, es decir, su actividad como función de la concentración en iones hidrógeno, se pueden establecer mediante el equilibrio entre las moléculas de él, las del substrato y los iones H y OH; en muchos casos la Diastasa es, no solamente un electrólito débil, sino también un anfólito o electrólito anfótero, capaz de combinarse indistintamente con ácidos y con bases; y, por consiguiente, muy sensible a las variaciones de P_H de cuyo valor depende directamente su equilibrio de disociación.

La condición orgánica de las Diastasas no es, tampoco, absoluta puesto que casi siempre requiere para ser activa, el concurso de cuerpos inorgánicos; principalmente iones metálicos.

La calidad primordial de un Fermento es la de ser un agente catalítico; en la casi totalidad de las veces, es un acelerador de las reacciones. Pero únicamente de aquellas reacciones que producen energía libre porque el fermento no introduce en el sistema nin-

guna energía extraña y no es, tampoco, capaz de transformar la naturaleza de los procesos biológicos. En su condición de catalizador, el fermento es muy inferior a los catalizadores artificiales porque no actúa más que sobre una cantidad limitada de substrato y su actividad se debilita progresivamente. Pero su acción es decisiva siempre porque actúa sobre reacciones biológicas, es decir orgánicas; y éstas se caracterizan por ser todas carbonadas. Ahora bien la existencia indefectible del elemento carbono en la molécula de toda substancia orgánica, transmite a ésta las características de aquél; su indiferencia química, su plasticidad y su indolencia. El carbono, que ocupa la cabecera del grupo IV o central en la serie de elementos químicos, se une con análoga afinidad e indiferentemente a otros átomos, ya sean éstos positivos o negativos; se deja influenciar por estos otros elementos disimulando sus genuinas propiedades; y es perezoso en su acción.

Por eso las reacciones en Bioquímica son lentas; y muchas veces limitadas estando la zona de su reversibilidad en los límites de las temperaturas ambientes; transcurren con ligera entonación térmica. Las moléculas orgánicas, por ser carbonadas, son poco reactivas, y no son electrófilas ni ionizadas ni polares (cuando líquidas).

De todo esto se deduce la importancia extraordinaria que tiene la presencia de un activador o acelerador de dichas reacciones; función que desempeña el fermento como agente catalítico que es. Actúa en medio o sistema microheterogéneo, es decir, coloide; y la catálisis tiene, por lo tanto, lugar en la superficie de las micelas del substrato.

*
* *

El mecanismo de acción de los Fermentos o Diastasas ha sido muy discutido y se han ideado diversas hipótesis para explicarlo.

Partiendo del principio de la catálisis en medio heterogéneo, BAYLISS supone tres períodos o etapas sucesivas en el proceso de su actividad: La primera es de *difusión* del substrato en el fermento disuelto (o contacto íntimo entre los dos si el último no está en disolución); la segunda es de *adsorción* del substrato por la Diastasas en virtud de la naturaleza coloidal de ésta; la tercera es puramente de *acción química* del fermento sobre el substrato, con formación posible de compuestos de adición lábiles de índole química o

físico-química. Esta última etapa puede no producirse y quedar entonces el fenómeno en un caso de *catálisis por adsorción*.

Pero lo característico de esta teoría es la admisión de la necesidad de que se formen compuestos de adsorción entre la encima y el substrato, *antes* de que se desarrolle la actividad de la primera.

En la teoría de MICHAELIS y MENTEN (1913), se admite como principio fundamental, que la unión entre el fermento y el substrato obedece a la ley de acción de las masas. Así p. e. un mol de Fermento (F) se une con un mol de sacarosa (S) y la unión resultante (FS) se desdobla por hidrolisis en Fermento, Glucosa y Fructosa conforme a la ecuación $K = \frac{(F).(S)}{(FS)}$ en donde K es la constante de disociación; además la velocidad de la transformación (V) es directamente proporcional a la cantidad formada del compuesto (FS) en un tiempo dado; por otra parte, la cantidad de S unida a F es muy pequeña en relación con la cantidad total de S; y finalmente la unión FS es reversible pero regida también por la ley de acción de masas. La teoría es válida también para el caso de las esterasas, pero no para otras muchas Diastasas como lo han probado RONA, AMMON y otros investigadores (1931).

Se puede considerar también la unión FS desde el punto de vista de la isoterma de adsorción, sin oponerse a la aplicación de la ley de GULDBERG y WAAGE (de acción de masas). Se puede establecer, para todas las reacciones encimáticas, su curva de actividad (actividad en función del logaritmo de la concentración del substrato) como si fuera la isoterma de adsorción conforme a la concepción de LANDSMUIR, con lo cual se compaginan las dos teorías: la que supone que la unión FS obedece a la ley de acción de masas (actividad proporcional a la masa) y la que establece que sigue las leyes de adsorción (actividad proporcional a la superficie). WILSTAETTER se opone a la idea de que el fermento no sea un individuo químico y que sus propiedades dependan exclusivamente del estado de dispersión coloidal en que se encuentra su materia. Estima por el contrario, que un fermento es un sistema formado por un cuerpo de estructura química bien definida extendido en la superficie de un soporte coloidal de naturaleza albuminoidea; el primero es responsable de la especifidad de la Diastasa y el segundo, de la estabilidad y actividad del sistema; los dos elementos son necesarios y la destrucción de uno de ellos, o su separación del otro, hace que se pierda toda la actividad diastática. El sistema Fermento-Soporte

constituye un caso de unión o combinación especial que el propio WILSTAETTER denomina *Simplexo* y que se distingue de las combinaciones de adsorción porque son genuinamente específicas, y de los complejos de WERNER porque no están formados por iones; pero poseen cierta analogía con estos últimos porque la unión de los cuerpos componentes del simplexo tiene lugar en virtud de valencias residuales de ellos. Se consideran también como simplexos todos los proteídos (grupo prostético-proteína), el sistema antigeno-anticuerpo, la tireoglobulina (tiroxina-albúmina), la unión lignina-celulosa, etc. Aplicando este concepto a los Fermentos, KRAUT y W. V. PANTSCHENKO-JUREWICZ (1936) designan al grupo activo con el nombre de *Agon* y al soporte con el de *Feron* (ortografía y fonética españolas). Al conjunto es aplicable la ley fundamental de química, llamada de acción de las masas o ley de GULDBERG y WAAGE, y por lo tanto, se tendrá para este simplexo:

$$\frac{(\text{Agon}).(\text{Feron})}{(\text{Simplexo})} = \text{K (Constante)}.$$

que expresa no solamente la existencia en estado libre de los dos componentes del sistema o simplexo sino la proporción en que deben estar entre sí y con relación a este último; ya veremos más adelante cómo ha sido posible el aislamiento y separación de los dos componentes. En la concepción de EULER y MIRBAEK (1932), el fermento completo se llama *Holofermento* y está integrado por el genuino fermento (denominado *Apofermento*) *unido al coadyuvante* (que es el *Co-fermento*); del modo reversible expresado en la siguiente ecuación:

$$\text{Apofermento} + \text{Cofermento} \rightleftharpoons \text{Holofermento}$$

y obedeciendo también a la ley de acción de masas estos tres cuerpos. Ejemplos de estos sistemas son los siguientes, como estudiaremos más adelante:

Apo	*Co*		
Globina	+ Hem	$\rightleftharpoons$	Hemoglobina.
Proteína	+ Vitamina B_2	$\rightleftharpoons$	Fermento amarillo.
Proteína	+ Difosfato de vitamina B_1	$\rightleftharpoons$	Carboxilasa.
Proteína	+ Pirofosfato de adenina	$\rightleftharpoons$	Fosforilasa.
Proteína	+ Hemina (catalasa)	$\rightleftharpoons$	Catalasa.

Esta teoría se llama *de las dos afinidades* porque en la unión FS intervienen dos clases de afinidad; la que une el *Apo* y la que une el *cofermento* con el substrato. Pero las dos obedeciendo a la ley de acción de masas. El *Apo* es responsable de la actividad y de la especificidad de la Diastasa en tanto que el *Co* lo es de la acción química sobre el substrato.

Si se supone, como admiten todas las teorías, que las reacciones diastásicas son de *catalisis por adsorción* (y más concretamente, de *catalisis por contacto*) la unión FS será de tipo químico pero muy especial porque las fuerzas de unión no varían de modo continuo sino por *cuantas* de energía; serán uniones de las llamadas de covalencia en las que el catalizador (fermento) suministra siempre un electrón. BARENDRECHT explica el efecto encimático como una especie de irradiación de energía del fermento al substrato; quizá de naturaleza parecida a la de los rayos mitogenéticos.

El descubrimiento reciente de la constitución química de diversas Diastasas ha hecho crisis en muchas de las teorías tan confusamente expuestas. Y son pura y simplemente reacciones químicas las que tienen lugar entre los grupos prostéticos bien definidos, de esas Diastasas y los Substratos. Con lo complicidad natural que deriva de la presencia de la parte protéinica del Fermento, la cual actúa muchas veces, y de los elementos coadyuvantes (activadores, cofermentos, etc.). Modernamente se admite con casi absoluta unanimidad el concepto de Diastasa-Substrato, es decir, de unión del Fermento con el Substrato, quizá por inducción electrónica de uno sobre otro (TAYLOR); algunos investigadores, como MEDWEDEW, sin negar la existencia de esa unión, suponen que la acción encimática es producida por colisiones de orden elevado entre Fermento y Substrato.

FACTORES Y LEYES DE LA ACCION DIASTASICA

Pero considerando al Fermento como un catalizador, teniendo en cuenta su naturaleza coloide (o por lo menos la de su soporte) y los compuestos de adsorción que puede originar con el substrato, la medida de su actividad diastásica o encimática (que es la de la aceleración que impele a la reacción que activa), depende de los siguientes factores:

D. 6.00 1.75 [2550]

1º *La actividad es proporcional a la cantidad presente de Fermento.*—Esto sucede en los llamados sistemas homogéneos y es aplicable a los microheterógenos (Fermentos) únicamente dentro de ciertos límites. Entonces la marcha de la reacción puede ser la de una reacción monomolecular y su velocidad se expresa por la cononocida fórmula:

$$V = \frac{dx}{dt} = K(A - x)$$

en la cual *V* es la velocidad de reacción, *dx* es la diferencial de la cantidad *x* de substancia transformada, *dt* es la diferencial del tiempo *t* empleado en la transformación, *A* es la concentración inicial de la substancia única que se transforma y *K* es la constante de velocidad; la integración de la fórmula anterior para $t = 0$ y $x = 0$, nos da el valor de K; $K = \frac{1}{t} \log_n \frac{A}{A-x}$ que es la expresión algebraica de una línea recta en sistema de ejes coordenados. Lo cual quiere decir que la ley que exponemos es rigurosamente exacta. En la práctica no sucede de modo absoluto esa proporcionalidad entre la actividad y la cantidad de fermento porque muchas veces éste se une con los productos de la reacción y otras se sostiene fuertemente unido al substrato; el cálculo de estas acciones influyentes se ha llevado a cabo en el caso de la sacarasa (antigua invertina) y se establecen las curvas de velocidad (ya no son *rectas* por la razón dicha).

La reacción puede ser de segundo orden o bimolecular y entonces la expresión de la velocidad es:

$$V = \frac{dx}{dt} = K(a-x)(b-x)$$

siendo *a*, *b* y *x* las concentraciones de los dos cuerpos reaccionantes y la cantidad transformada de uno de ellos en el tiempo *t*; la integración da:

$$K = \frac{1}{(a-b)t} \log_n \frac{b(a-b)}{a(b-x)}$$

expresiva de una curva de segundo orden; en el caso de que los dos cuerpos reaccionantes actúen en proporciones equimoleculares $a = b$ y la fórmula se simplifica:

$$K = \frac{1}{t} \cdot \frac{x}{a(a-x)}$$

este es el caso de la saponificación de esteres por las esterasas; principalmente las lipasas.

Pero lo dicho anteriormente se refiere a reacciones irreversibles y las Diastasas pueden muchas veces ejercer acciones reversibles; entonces la velocidad de la reacción es la diferencia algebraica de los valores de las velocidades de las dos reacciones que determinan el equilibrio; lo que se establece y determina entonces es la constante de equilibrio que es la relación o cociente de las constantes de las dos reacciones. El caso se da en la esterificación y la saponificación conjuntas:

$$\text{Acido} + \text{alcohol} \rightleftharpoons \text{Ester} + \text{agua}$$

y llega un momento de equilibrio entre las dos reacciones inversas, el cual es independiente de la presencia y cantidad del fermento:

$$K = \frac{K_1}{K_2} = \frac{(\text{ácido}).(\text{alcohol})}{(\text{ester}).(\text{agua})}$$

2ª *La actividad del fermento es proporcional a la cantidad de substrato.*—Una consecuencia de la ley anterior. La cantidad de substrato transformado va decreciendo progresivamente en tiempos sucesivos; al comienzo rápidamente y luego con lentitud.

La cantidad de substrato transformado por unidad de tiempo (velocidad) es proporcional a la cantidad que aun queda intacto. Esto no es absoluto ni sucede siempre. En el caso de la Diastasa gástrica, la Pepsina (que actúa sobre las albúminas desintegrándolas por hidrolisis en medio ácido) la cantidad de albúmina digerida, peptonizada o transformada en un tiempo determinado no es proporcional a la cantidad de pepsina presente sino a la raíz cuadrada de esta cantidad (Regla de Schutz-Borisow).

3ª *La actividad del fermento se favorece por la temperatura.*—Todas las reacciones diastásicas tienen una temperatura óptima; pero muy limitada. En general la velocidad de una reacción química aumenta con la temperatura (según expresa la regla de Vant' Hoff, llamada RGT (Reaktions-Geschwindigkeit-Temperatur) y también ley exponencial: $V = KA^t$ en la cual V es la velocidad, t la temperatura, A la cantidad de substancia transformada y K una constante); puede apreciarse que la velocidad crece en progresión geométrica cuando la temperatura lo hace en progresión aritmética; de forma que aquélla es función exponencial o logarítmica de ésta (y no función lineal, que expresaría una proporcionalidad

directa). Por lo tanto el aumento de velocidad de reacción cuando se eleva la temperatura en 10° p. e. es mucho mayor si pasa ésta de 40° a 50° que si pasa de 30° a 40°. Pero ya vimos antes que todos los substratos son substancia orgánica y, por consiguiente, la zona de reversibilidad de sus reacciones se alcanza pronto y entonces la reacción no progresa apenas por aumento de temperatura. Por otra parte todas las Diastasas son termolábiles y a temperaturas superiores a 50° ó 70° quedan inactivas o destruídas; si se citan casos de fermentos resistentes a la ebullición de sus disoluciones (sacarasa, tripsina, lacasa) son muy raros y muy discutidos. Por esta doble consideración, de la sensibilidad que tienen para el calor, tanto el substrato como el Fermento, se comprenderá que está muy limitada y condicionada la acción favorable de la temperatura sobre la actividad de los Fermentos. En general las Diastasas animales tienen como temperatura de máxima actividad la de 40° C. en tanto que las de origen vegetal poseen un óptimum más alto que alcanza hasta los 80° C. en el caso de una rennina o *fermento-lab*, extraída de una planta. La influencia nociva de las temperaturas más altas sobre los Fermentos se explica por la coagulación de su soporte coloidal, por la desunión del simplexo que forma con éste, y por la destrucción del compuesto de adsorción que forma con el substrato según una de las reglas de FREUNDLICH.

4º *La actividad del fermento requiere un valor determinado de* P_H *para cada caso.*—Los fermentos son, todos ellos, muy sensibles frente a los ácidos o las bases los cuales frecuentemente los destruyen o los inactivan. En algunos casos como el de la Sacarasa, la proporcionalidad entre la velocidad de la reacción y la concentración en iones hidrógeno es tan rigurosa que permite medir esta concentración determinando la cantidad de producto transformado mediante el empleo del polarímetro; (una molécula de sacarosa tiene un poder rotatorio: $(\alpha) = +66.5°$ y se desdobla, por la acción hidrolítica de la Invertina o Sacarasa, en una mezcla equimolecular de Glucosa: $(\alpha) = +52.5°$ y de Fructuosa $(\alpha) = -92.3°$ con un poder rotatorio total igual a la suma algebraica de los anteriores, o sea $(\alpha) = -39.8°$; se *invierte* así el sentido de la rotación y de ahí el nombre de *inversión* dado a este fenómeno, de *azúcar invertido* a la mezcla de glucosa y fructosa resultante, y de *Invertasa* o *Invertina* a la *Diastasa* que lo determina o acelera).

He aquí una tabla, tomada del libro de FALK, en donde se consigna el óptimo de P_H para diversas diastasas:

Diastasa	*Optimo de* P_H	*Autor*
Amilasa salivar	6,1-6,9	MICHAELIS y PECHSTEIN.
Amilasa pancreática	7,0	SHERMAN, THOMAS y BALWIN.
Amilasa de malta	4,6-5,2	LUERS y WASMUND.
Catalasa	7,0	SOERENSEN.
Erepsina intestinal	7,7	RONA y ARNHEIM.
Fosfatasa de hueso	9,5	ROBISON.
Fosfatasa de plasma	8,8-9,2	KAY.
Fosfatasa de eritrocitos	6,0-6,8	J. ROCHE.
Fosfatasa vegetal	3,4-6,0	KAY y LEE.
β - Glucosidasa	5,0	E. FISCHER.
Lipasa pancreática	8,0	DAVIDSON.
Lipasa gástrica	4-5	DAVIDSON.
Lipasa salivar	7,6-7,8	KOLDAYEV y PIKUL.
Lipasa de ricino	4,7	HALEY y LYMAN.
Maltasa	6,1-6,8	MICHAELIS y RONA.
Papaína	4,7	GRASSMANN.
Pepsina (sobre albúmina de huevo)	1,2-1,6	SOERENSEN.
Renina	5,4	FENGER.
Sacarasa intestinal	6,8	EULER y SVANBERG.
Sacarasa de levadura	4,4-4,6	SOERENSEN. FALES y NELSON.
Tripsina pancreática	8,0	LUNDEN.
Tirosinasa	6,8	RAPER.
Ureasa	7,0	VAN SLYKE y ZACHARIAS.

La influencia de la reacción del medio sobre la actividad diastásica es debida unas veces a la calidad de electrólito anfótero que poseen los Fermentos; pero en otras esa influencia se deja sentir sobre el substrato preferentemente, modificándolo hata el extremo de hacerlo incapaz de fermentar.

5º *La actividad del Fermento es influída por substancias inorgánicas.*—Tanto por la naturaleza coloide del Fermento, de su soporte albuminoso, o del substrato, como por su característica de electrólito, es bien lógico que todas las Diastasas se encuentren influídas en su acción por la presencia de iones metálicos o de sales minerales. Muchas veces estos cuerpos son coagulantes de coloides y otra son, de por sí, agentes catalíticos que coadyuvan a la acción diastásica. Tendremos ocasión de ampliar estos concepto cuando nos ocupemos de "Activadores y Paralizantes".

6º *La actividad del Fermento es influída por los productos de la misma reacción que acelera aquél.*—Esta influencia tiene diversos orígenes. Uno de ellos es la reversibilidad de la acción distásica; en su virtud, la reacción se detiene al cabo de un cierto tiempo estableciéndose un equilibrio químico entre los cuerpos reaccionantes y los productos de la reacción. Otro de ellos es la modificación de la reacción del medio por los productos originados; ya vimos antes cuan sensibles son los Fermentos a la concentración diversa en iones hidrógeno. También pueden esos productos combinarse con el Fermento inactivándole; o con su soporte albuminoideo, coagulándole; o con el substrato, incapacitándole como substancia fermentescible. Otras veces, los cuerpos producidos coadyuvan a la acción diastásica, como ocurre en los procesos de autolisis que estudiaremos más adelante.

7º *Existe un sistema regulador de la actividad de los Fermentos, en el interior de los organismos.*—La acción permanente de un Fermento es tan perjudicial como su inactividad o ausencia pues muchas reacciones biológicas necesitan ser retardadas o detenidas en determinados momentos. Por otra parte, muchas Diastasas son de acción reversible, de análisis y de síntesis según las condiciones en que actúa. Algún sistema ha de regular *in vivo* estas actividades, (aceleratrices, retardatrices, paralizantes, etc.) de un mismo Fermento. Seguramente los centros nerviosos, las hormonas y algunas vitaminas, intervienen y rigen esta regulación. Se observa por ejemplo, que la sangre no tiene *"Fermentos de defensa"* capaces de desdoblar los cuerpos extraños que llegan a ella; pero los elabora en pocos días. En esto se basa la conocida reacción de *Abderhalden* para el diagnóstico precoz del embarazo.

PROPIEDADES

Además de las propiedades generales, ya descritas anteriormente al ocuparnos del mecanismo de la acción diastásica, debemo consignar ahora algunas otras de especial interés. Muchos Fermentos pueden adoptar formas cristalinas; su naturaleza genuinamente coloide (en cuyo estado el valor numérico de las propiedades es función de la superficie) no empece para que se haya logrado cristalizar muchas de ellas (en el estado cristalino ese valor numérico es función de la dirección en que se mida en el cristal). La primera

diastasa cristalizada la obtuvo SUMNER en 1926 de la harina de semilla de soja extrayéndola con acetona diluída a baja temperatura; se consiguen así cristales octaédricos de *Ureasa* pura. Precipitando con sulfato magnésico a saturación, una solución en ácido sulfúrico diluído de *pepsina* comercial, diluyéndola en álcali y reprecipitando con ácido, consigue NORTHROP, la *Pepsina cristalizada*. Por el mismo investigador, en colaboración con KUNITZ, se ha logrado cristalizar *Tripsina*, añadiendo sulfato amónico a saturación a una disolución concentrada del Fermento en la misma sal al 25%; se ofrece en largas agujas y en rosetas. Los mismos autores han cristalizado también el *Quimotripsinógeno*. CALDWELL, BOOHER y SHERMAN (1931) han obtenido *Amilasa* pancreática en estado cristalino. Ya en 1936 se conocían *diez* Diastasas cristalinas y durante el año antepasado se han conseguido tres más: *Proteinasa* (Ficina), *Catalasa* y *Papaína*; esta última de especial interés para México porque la planta y el fruto que la contienen es muy abundante en este país. La lista completa de las Diastasas cristalizadas que actualmente se conocen, es la siguiente:

Ureasa (SUMNER). — *Catalasa* (SUMNER). — Pepsina (NORTHROP). — Pepsinógeno (NORTHROP). — Tripsina (NORTHROP). — Tripsinógeno (NORTHROP). — Quimotripsina — (NORTHROP). — Quimotripsinógeno (NORTHROP). — Carboxipeptidasa (ANSON). — Amilasa (CALDWELL).—Fermento amarillo (WARBURG y THEORELL). — Ficina (WALTI). — Papaína (BALLS).

A esta relación deben añadirse los Cofermentos siguientes: Coencima (WARBURG). — Cocimasa (EULER). — Cocarboxilasa (LOHMAN).

La composición elemental de algunos Fermentos, ha sido establecida; se consigna en este cuadro tomado de HARROW y SHERWIN:

Nombre	C	H	N	S	P	Cl	Autor
Ureasa cristalizada.....	51,6	7,10	16,0	1,2			SUMNER
Pepsina cristalizada.....	52,4	6,66	15,4	0,85	0,078	0,21	NORTHROP
Tripsina cristalizada.....	50,0	7,20	14,9	1,10	0,000	2,88	NORTHROP
Renina (Lab) purificada...	61,33	7,02	14,4	1,19	0,000	0,00	TAUBER

Por su naturaleza genuinamente coloide (aunque el grupo activo no lo sea, siempre lo es el soporte), los Fermentos son muy débilmente difusibles, propiedad que permite purificarlos de la sales minerales que les acompañan en los procesos de su obtención. Por

esta misma razón su presión osmótica (presión oncótica) es muy pequeña y, por lo tanto, su peso molecular debe ser muy grande, cual corresponde a cuerpos de naturaleza albuminoidea. He aquí un cuadro que lo demuestra:

Nombre	*Peso molecular*	*Autor*
Sacarasa	19.600	EULER, MYRBAECK, JOSEPHSON.
Catalasa (Hígado de vaca)....	16.300	STERN.
„ (Sangre de vaca)....	250.300	STERN.
Pepsina	36.000	NORTHROP.
Fermento amarillo.....	73.000	THEORELL.
CO-Hemoglobina	68.600	NORTHROP y ANSON.

Las presiones elevadas (once a quince atmósferas) destruyen algunos fermentos tales como la lipasa y la amilasa.

La agitación enérgica y prolongada hace disminuir progresivamente la actividad de la tirosinasa, la renina, la amilasa y la pepsina. El fenómeno es una acción de superficie que determina una coagulación de parte o del todo del fermento.

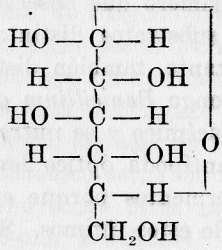
Las radiaciones ultravioletas ejercen una acción destructura de los fermentos; o por lo menos, paralizante de su actividad. En medio alcalino y en presencia de oxígeno, se destruyen de este modo la catalasa y la peroxidasa. Las carbohidrasas son los fermentos más resistentes a estas radiaciones.

Muchos fermentos son fluorescentes; al estado sólido y ofrecen fluorescencia azul las Amilasas y la Emulsina; y azul y amarilla a la vez, la Ureasa. En disolución acuosa, además de los citados, tiene fluorescencia azul la Pepsina, la Papaína y la Mirosina. En donde más se ha investigado esta propiedad ha sido en los llamados fermentos respiratorios; se ha podido apreciar que la fluorescencia verde del Fermento respiratorio de WARBURG es debida a la flavina que contiene; algo análogo ocurre con la fluorescencia del mismo color que presenta la Catalasa I (impurezas de flavina). La Codehidrasa II tiene bella fluorescencia azul en medio ácido y verde en medio alcalino; se ha considerado que era también debida a una impureza, pero modernamente se ha demostrado que la hidrogenación de este fermento (fijación de H en su núcleo piridínico) determina la producción de fluorescencia blanca muy característica; lo mismo sucede si la reducción

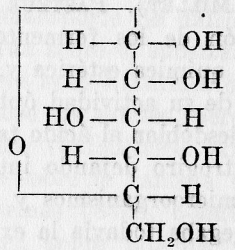
se hace con hidrosulfito sódico; bien sea de la Codehidrasa II o de otros derivados piridinicos. Finalmente, el Citocromo-c oxidado produce una fluorescencia rojo sombra, lo cual es significativo puesto que en general los compuestos resultantes de unión de Porfirinas con hierro (como es el citado Citocromo-c) pierden por completo la fluorescencia que en general tienen todas las Porfirinas libres. (DHÉRÉ).

ESPECIFICIDAD

Una de las propiedades que merecen capítulo aparte, por su importancia, es la *especificidad.* El concepto más estricto es el que expresa que cada fermento actúa solamente sobre un compuesto fermentescible o substrato. Aun las más pequeñas variaciones en la estructura química de éste, determinan que el Fermento ya no active. Para cada substancia un fermento; para cada fermento una substancia; la *ureasa* no actúa más que sobre la urea y la urea no se descompone por otro fermento que la ureasa. El caso más restringido se da en la acción de ciertas diastasas sobre cuerpos isomeros estereoquímicos. La glucosa funciona según dos estructuras químicas distintas diferenciadas con las letras α y β (glucopiranosa α y β; glucofaranosa α y β):



Glucopiranosa α



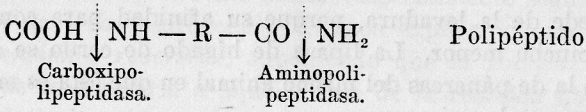
Glucopiranosa β

la substitución de H de los grupos OH señalados con asteriscos en las figuras por radicales diversos, nos da las fórmulas desarrolladas de los cuerpos llamados, respectivamente: Glucósidos ∝ y Glucósidos β; los primeros no se desdoblan en sus componentes más que por la diastasa denominada *Glucosidasa* α que existe en la levadura de cerveza; los segundos lo hacen solamente por la *Glucosi-*

dasa β que es uno de los fermentos integrantes de la emulsina de la almendra amarga; por la α se hidroliza p. e. la maltosa y por la β, la galactosa. La especificidad de estas diastasas es, por lo tanto, extraordinariamente restricta y se la denomina, *especificidad estereoquímica.* Y aun llega más allá; porque si en un glucósido β (desdoblable por la emulsina) sustituímos el grupo terminal CH_2OH por un metilo, CH_3, continúa siendo desdoblable; pero si lo hacemos por CH_2Br, ya no se hidroliza por la Glucosidasa β como no se hidroliza tampoco si dicho terminal CH_2OH desaparece por completo y entonces la glucosa se cambia en xilosa (pentosa) y los glucósidos en xilósidos; se ve que la acción del fermento depende de la existencia de dicho grupo terminal. Caso análogo es el descubierto por E. FISCHER en los dipeptidos formados por los amino-ácidos (dextro y levogiros) denominados alanina y glicina; la *Dipeptidasa* del jugo pancreático no hidroliza a las glicil-alaninas, pero sí a las alanil-glicinas (especificidad de estructura); pero aun a estas últimas lo hace con diferente velocidad según se trate de las formas *dextro* o *levo* de los amino-ácidos integrantes (especificidad de estereoisomeria). Las *Fosfatasas* extraídas de mamíferos hidrolizan a los esteres *mono*fosfóricos de la glucosa pero lo hacen con gran dificultad, a los *di*fosfóricos; y la propia fosfatasa de los eritrocitos actúa mucho más enérgicamente sobre el ácido glocerofosfórico α que sobre el β (HENDERSON y MILLET). PASTEUR fué el primero que observó la diferente acción de los fermentos sobre substratos distintos por su estructura química estérica y, por lo tanto, también distintos por el sentido de su actividad óptica; el hongo *Penicillium glaucus* es capaz de desdoblar al ácido tartárico racémico y se nutre solamente del dextrogiro dejando intacto el antípoda óptico levogiro; se habla de microorganismos y no de fermentos porque en aquella época se negaba todavía la existencia de estos últimos. Se ha pretendido explicar esta *especificidad* con el símil tan conocido, ideado por E. FISCHER y llamado "de la llave y la cerradura"; no penetra un fermento más que en un substrato de configuración adecuada, lo mismo que una llave no entra más que en su cerradura.

La especificidad de las Diastasas puede ser algo más amplia como ocurre con las *Polipeptidasas,* que son los fermentos hidrolíticos de los Polipéptidos; unas de ellas, las *Aminopolipeptidasas,*

rompen la cadena del substrato en la extremidad que soporta el grupo amino, NH_2, desprendiéndole; en tanto que las *Carboxipolipeptidasas,* lo hacen por el extremo que tiene el carboxilo, COOOH:



Aquí la especificidad se concreta a lo dicho; el número de polipéptidos, reales y posibles, es casi infinito; sobre todos ellos actúan estas diastasas; pero siempre lo hacen en la forma dicha.

La especificidad se desfigura todavía más cuando la diastasa actúa sobre todo un grupo de cuerpos análogos; las *lipasas* sobre las grasas, p. e. Pero aun aquí es necesario consignar que una lipasa cualquiera no actúa sobre cualquier grasa; por lo menos, debemos distinguir las genuinas lipasas de las *esterasas* que solamente actúan sobre los esteres formados por los ácidos grasos de pequeño número de átomos de carbono (tributirina, butirato de metilo).

Más amplio es todavía el concepto en otras diastasas como las llamadas *Desmolasas,* que no tienen en realidad más que una especificidad de reacción; no desdoblan al substrato en sus componentes como hacen las *Hidrolasas,* sino que le transforman de los modos más diversos: Descarboxilación, deshidrogenación, oxidación, desprendimiento de oxígeno molecular, transporte de hidrógeno, etc. En muchas ocasiones el Fermento actúa sobre el substrato y sobre cuerpos análogos químicamente a él, ya sean naturales o artificiales. La esterasa del hígado actúa sobre los esteres, pero también lo hace con las lactosas de los oxiácidos (oxibutírico, oxivalérico). La *xantinoxidasa,* actúa no solamente sobre la xantina (2-6-dioxipurina) sino sobre otras muchas purinas (8-oxi, 6-amino, 2-oxi, 6-amino, 8-oxi, 2-8-dioxi); y también sobre muchos aldehidos. (Booth).

La *Arginasa* ejerce su acción sobre la arginina y también sobre su homólogo superior; en general actúa sobre cualquier substrato que posea guanidina libre y grupos carbóxilos (Felix y Schmeider). Recíprocamente, se conocen casos de substancias químicas que pueden suplir a la acción de ciertos fermentos. Tal sucede p. e. con los substituyentes de las esterasas; la glicilglicina y el ácido espártico saponifican numerosos esteres.

La Escuela de WILLSTAETTER ha establecido la noción de *especificidad relativa.* Una misma diastasa muestra actividades diferentes con el mismo substrato según sea su origen o su modo de prepararla. La sacarasa animal no actúa sobre la rafinosa como lo hace la que procede de la levadura, porque su afinidad para con el substrato es mucho menor. La lipasa de hígado de cerdo se distingue mucho de la de páncreas del mismo animal en que ésta es muchísimo más activa que la primera.

HALDANE amplía el concepto de especificidad al substrato. Efectivamente existen casos de una sola diastasa que actuando sobre el mismo substrato lo transforma de modo distinto según el órgano en donde esté. La *cimasa* de la levadura cambia a la glucosa en alcohol y anhídrido carbónico pero la cimasa del músculo la transforma en ácido láctico. WILLSTAETTER da el nombre de *Diastasas isodinámicas* a las de la misma clase y acción que transforman al mismo substrato en productos diferentes. Además del caso anterior de la cimasa, puede citarse el de las amilasas α (*dextrinogénicas*) y β (*sacarogénicas*); las dos actúan sobre el almidón, pero las primeras lo desdoblan solamente hasta el término de dextrina en tanto que las β lo llevan hasta el de sacárido (maltosa); todas las amilasas animales son α.

Puede apreciarse por todo lo expuesto, que el concepto de especificidad de Fermentos ha ido evolucionando hasta el extremo de que actualmente casi no puede encerrarse más que en los límites bien amplios de los grandes grupos de aquéllos; una carbohidrasa no actúa más que sobre carbohidratos y no lo hace sobre grasas ni sobre albúminas; una lipasa ejerce su acción sobre grasas únicamente en tanto que una proteasa lo hace sobre proteínas.

REVERSIBILIDAD

Otra interesante propiedad de las Diastasas es la *Reversibilidad* de su acción. PAYEN (1891) fué el primero que observó cómo se detenía la ación de la amilasa sobre el almidón conforme se acumulaba en el líquido la glucosa producida. Muchos años después CROFT HILL, llevó a cabo la experiencia definitiva de someter la glucosa a la acción de la maltasa de la levadura y consiguió la producción de maltosa; el proceso químico es de síntesis contrariamente al normal que es hidrolítico, de desdoblamiento de la maltosa en

dos moléculas de glucosa. Se comprende fácilmente que esta reversibilidad tenga lugar en todas las acciones de diastasas porque ellas conducen a equilibrios químicos, que se rompen en uno u otro sentido según las condiciones del medio (especialmente según la concentración de iones hidrógeno). TAYLOR explica lo que él llama *Catalisis encímica reversible*, suponiendo que la *Encima* suple la energía que es necesaria a aquella fase de la reacción que es responsable de la inercia; conforme avanza la reacción, la fuerza motriz de ésta devuelve a la Encima la energía anticipada; el llamado "Efecto inductivo" forma parte del mecanismo según el cual la Encima activa al substrato. La aplicación de esta reversibilidad ha sido hecha, de modo muy interesante, por BOURQUELOT para conseguir, por síntesis distásica, la producción de muchos glucósidos y polisacáridos haciendo actuar las Glucosidasas α y β (levadura o emulsina) sobre las glucosas en presencia de cuerpos diversos (azúcares, fenoles, alcoholes, etc.). BAYLISS ha logrado también combinar glicerina y glucosa mediante la acción de la emulsina. POTTEVIN ha conseguido producir trioleína uniendo ácido oleico y glicerina con el concurso de la lipasa pancreática.

Otro ejemplo típico de reversibilidad es la que ofrecen las Lipasas, lográndose sintetizar grasas mediante su acción sobre una mezcla de glicerina y ácidos grasos. En algunos casos predomina la acción sintetizante de la Diastasa sobre la hidrolizante o analítica; tal sucede con la *Fosfatasa* que colabora a la formación del fosfato cálcico del hueso. Puede por lo tanto hablarse de "Diastasas sintetizantes" en términos generales porque todas son activas tanto en los desdoblamientos como en las síntesis. Claro es que hablamos de las *Hidrolasas* porque en las *Desmolasas*, el fenómeno sintetizante se negaba afirmando especialmente que la ruptura, por vía diastásica, de la cadena carbonada de un compuesto químico no es nunca recompuesta por los mismos factores. El descubrimiento de la *Carboligasa de* NEUBERG, vino a destruir ese aserto; existe en la levadura y actúa sobre el etanal condensándolo consigo mismo, en una de las fases de la fermentación alcohólica; la condensación tiene lugar entre los grupos funcionales de las dos moléculas de aldehido, y se produce una acetoína:

$$CH_3 - COH + HOC - CH_3 = CH_3 - CO - CHOH - CH_3$$

contrariamente a la aldolización, que es la condensación entre el

grupo aldehido de una molécula y el CH_3 de la otra, para producir un aldol:

$$CH_3—COH + CH_3—COH = CH_3—CHOH—CH_2—COH$$

La carboligasa puede actuar sobre cualquier otro aldehido produciendo la aciloina respectivamente. Este descubrimiento de una genuina *"Sinteasa"* era de extraordinario interés, pero ha sido muy discutido y hasta negado, por DIRSCHERL.

La síntesis determinada por una diastasa puede llegar hasta la producción de derivados ópticamente activos. Así p. e. ROSENTHALER logra condensar el ácido cianhídrico con el aldehido benzoico mediante la influencia de la emulsina; el nitrilo mandelico formado es dextrogiro, en tanto que los generadores eran inactivos a la luz polarizada. La actividad óptica ha sido determinada por la diastasa, quizá por inducción de la suya.

Propiedad muy particular de ciertas diastasas es la de su intervención en la *Autolisis*. Todo tejido u órgano animal, es digerido expontáneamente cuando muere aquél o se le separa de él. Este proceso es llevado a cabo por diversos fermentos, entre los cuales pueden señalarse Proteasas, Lipasas, Carbohidrasas, Fosfatasas, Nucleinasas; todas ellas, claro es, son Hidrolasas. Pero difieren de las que existen en el tubo intestinal y en el estómago, de las genuinamente digestivas. En condiciones apropiadas, el proceso de autolisis, puede continuar durante muchos meses y solamente se hace más lento conforme se acumulan los productos de la reacción, la cual es más viva en medio ácido. Así se explica la atrofia de la glándula mamaria después de la lactancia, del útero después del parto, y de los órganos en general cuando se alcanza edad avanzada; en todos los casos la acidez del medio no es neutralizada por la alcalinidad de la sangre y el proceso autolítico o pseudo autolítico se produce.

Ya decimos en otro lugar que la prevención contra la autodigestión de las propias albúminas constituyentes de los tejidos del aparato gastrointestinal (en donde tantas Diastasas digestivas existen) está en la producción automática de antifermentos.

ACTIVACION Y RETARDACION

La acción de los Fermentos es influenciada, como ya vimos antes, por diversas substancias; las unas de modo favorable, coad-

yuvando y acelerando su intervención en el substrato; las otras retardando o paralizándola; las primeras substancias se llaman *"Activadores"* y las segundas *"Retardadores"*. Los ejemplos de unos y otros se nos ofrecen con abundancia. La sacarasa y maltasa intestinales necesitan, para actuar, el concurso de sales neutras; la amilasa se activa en la presencia de ácidos aminados; la lipasa pancreática lo hace por los ácidos biliares de la bilis y por las sales de calcio; la papaína se activa por el ácido cianhídrico. El primer caso de activador que se conoció fué el de la *Enterokinasa*. Uno de los ayudantes del gran fisiólogo ruso PAULOW descubrió en el Laboratorio de éste (1899) que el jugo puro de una fístula pancreática era completamente inactivo para hidrolizar proteínas; pero esta actividad la adquiría en cuanto se le añadía jugo intestinal. Más tarde (1924) WALDSCHMIDT-LEITZ demostró que la Tripsina procedente del Tripsinógeno se activa mediante la adición de *Enterokinasa*; esta activación es debida a la destrucción de una substancia retardadora o paralizante de la tripsina, la cual es naturalmente activa, según investigaciones de DYCKERHOFF. Los cristales de Tripsina pura, obtenidos recientemente por NORTHROP y KUNITZ, según vimos antes, son activos; ignorándose si lo son porque ya les acompaña la Enterokinasa o porque están desprovistos de la substancia que dificultaba la acción. La Enteroquinasa no es de por sí una diastasa sino un genuino específico activador. El influjo del ClNa como activador de la amilasa a un $P_H = 7$ es debido fundamentalmente al ion cloro. El del cloruro calcio sobre la lipasa (conjuntamente con la albúmina) se debe a la formación de un simplexo albúmina-Fermento. Citemos todavía, como casos de activadores, al Magnesio para la Zimohexasa, las Glicerofosfatas y el Cofermento, a los fosfatos minerales, además, para la Cocimasa; al magnesio y a la adenina conjuntamente para las Fosfatasas. Otros ejemplos de activadores pueden todavía citarse. La *Papaína* que se inhibe con ácido ascórbico, se activa si luego se le agrega ion ferroso (MASCHMANN y HELMERT); a la *Catepsina* le ocurre lo mismo (EULER, KARRER y ZEHENDER); la *Arginasa* se activa con ácido ascórbico (ELDBACHER y LENTHARDT) y en cambio la *Ureasa* y la β *Maltamilasa* (PURR) se inhiben. La *Arginasa* inactiva del músculo de mamíferos se activa con sulfato manganoso, o con iones de cobaltoso, niqueloso y ferroso (KLEIN y ZIESE; HELLERMAN y PERKINS).

KUBOWITZ ha demostrado que la *Fenoloxidasa* es una Cupro-*proteína* que se inactiva con ácido cianhídrico y no se reactiva por dialisis porque pierde cobre; añadiendo al dializado una sal de cobre, se restablece la actividad.

Los casos pudieran multiplicarse, pero estimamos suficientes los expuestos, sin perjuicio de consignar algunos más en la parte descriptiva.

En los ejemplos anteriores se han consignado casos de activadores genuinamente *específicos* y de otros que no lo son; estos últimos están formados principalmente por iones y por sales metálicas. Los primeros actúan sobre un número muy limitado de Fermentos y en algunos casos sobre uno solo. Tal p. e. las *Kinasas* antes mencionadas y los Co-Fermentos, diferenciados solamente porque estos segundos son cristalinos, en tanto que las primeras son coloides. La activación de una diastasa puede explicarse por causas diversas: Porque suprime al retardador o inhibidor (eliminación de metales pesados por un thiol); porque añade un elemento indispensable (caso de los fosfatos, del magnesio, etc.); porque activa el substrato, a veces uniéndose con él (caso de los Co-Fermentos).

Contrariamente a la acción activante está la retardatriz, inhibidora o paralizante. La ejercen las sales de metales pesados, tales como las de mercurio, plata, plomo, etc., el ácido cianhídrico y los cianuros, etc.; a ello se debe la propiedad antiséptica y el uso corriente como tales, que tiene todos esos cuerpos; su acción se explica por ser coagulantes de coloides y actúan de ese modo sobre el fermento (a veces) y sobre su soporte (siempre). En el complejo proceso de la Fermentación alcohólica son agentes inhibidores o paralizantes: el FNa para la Enolasa y las Fosforilasas; el oxalato sódico para estas últimas en medio alcalino; los sulfitos alcalinos para las Reductasas; el fosfato disódico para la carboxilasa, el ácido iodo-acético para la Zimohexasa, las Dismutasas y la Hexoquinasa. Todos estos inhibidores o retardadores de la actividad diastásica actúan como verdaderos *venenos* de los fermentos, los cuales se reactivan por desintoxicación cuando se los priva de aquéllos; el caso está bien probado por la acción del cianuro potásico o de los thioles sobre los iones de metales pesados. La actividad de un fermento puede ser entorpecida o paralizada, en general, cuando se varían las condiciones en que ejerce

su acción (valor de P_H del medio, precipitantes de iones, coagulación de los coloides del sistema, etc.). El CNH, el CO o el SH_2, impiden la respiración con hierro de los fermentos respiratorios.

En íntima relación con los Activadores y Retardadores, están las Codiastasas, los Antifermentos y otros cuerpos. *Codiastasa* o *Cofermento,* es el coadyuvante del Fermento; muchas veces otro fermento, como veremos más adelante en los importantísimos casos de la Cocimasa y el Cofermento de las oxidaciones intraorgánicas. Se establece, desde este punto de vista la correlación siguiente:

Holocimasa o *Pancimasa* es el Fermento completo o conjunto total de ellos formado por Cimasas, coadyuvantes y Activadores; el ejemplo típico es el de la levadura de cerveza.

Apocimasa es la Holocimasa sin coadyuvantes. Está formada solamente por la Cimasa unida a los Activadores.

Etiocimasa es la Apocimasa sin activadores. Es Cimasa sola.

Coadyuvante es la Cocimasa, Codiastasa o Cofermento.

Activador es la substancia que acelera la acción del Fermento.

El *Antifermento* o *Antidiastasa* es el inhibidor o paralizador natural que se encuentra en los líquidos y tejidos del organismo animal, en estado normal o patológico; en general no son muy específicos. Y muchas veces su acción se concreta a retener al fermento mediante su adsorción; tal sucede con el negro animal respecto a la tripsina. La idea de la existencia de los Antifermentos nació al observar que en el organismo humano, especialmente en el tubo intestinal y en el estómago, las membranas que constituyen sus paredes no se corroen ni atacan por los jugos que ellas mismas segregan y los cuales son, en cambio, capaces de hidrolizar a las substancias albuminóideas alimenticias; se pensó entonces en que esto era debido a la producción de Antifermentos que preservan de la acción de los Fermentos. También se admite la producción de ellos para oponerse a los fermentos introducidos por vía parental; son como anticuerpos que actúan sobre antígenos y la mecánica de su acción se asemeja mucho a la de las substancias empleadas en Inmunología. Así p. e. se habla de antitripsina o de poder antitrípsico del suero, el cual se aumenta en las enfermedades infecciosas (broncopneumonía); pero no parece que sea una substancia genuinamente inmune, porque su ac-

ción no sigue las leyes físico-químicas de las reacciones antígeno-anticuerpo.

PREPARACION Y PURIFICACION

Los *Fermentos* o *Diastasas* se encuentran muy repartidos en los vegetales y en los animales; lo mismo en los organismos unicelulares (Bacterias, Hongos, Microbios en general) que en los más complicados; tejidos, órganos y líquidos intraorgánicos son ricos en estos activos cuerpos. Solamente una Diastasa existe exclusivamente en las plantas: la *clorofilasa*. Unicamente un Fermento es propio del organismo animal: la *Colinesterasa*. Todos los demás pueden encontrarse indistintamente repartidos en las dos clases de seres; o por lo menos en ellos, indistintamente, se producen cuerpos que ejercen análogas acciones sobre substratos idénticos.

Como todos ellos son substancias endocelulares que se encuentran disueltas y difusibles en su interior (*liodiastasas*), disueltas pero no difusibles (*endodiastasas*) o unidas al protoplasma (*desmodiastasas*) en el interior de aquéllas, es necesario, para obtenerlas, prensar, triturar o atacar, respectivamente, los conjuntos celulares que constituyen los tejidos y los órganos vegetales o animales; pero en muchos casos se utilizan, como primeras materias las propias y expontáneas secreciones de esos tejidos y órganos. Los jugos así obtenidos son muy inestables y se precisa conservarlos en nevera a baja temperatura. Es muy conveniente la adición de tolueno o de cloroformo para evitar la acción destructora de su actividad, que ejercen muchos microorganismos. Algunas veces se somete el material a la acción de la glicerina y el extracto glicérico se diluye luego con agua, separando por centrifugación el precipitado (siempre inactivo) que ocasionalmente puede producirse en la dilución. Otro medio de extracción es proceder con el órgano seco y pulverizado; el polvo fino se agita durante mucho tiempo con acetona para privarlo de agua y de materias grasas; el residuo se trata luego con éter. Este método tiene el inconveniente de que muchas veces la desecación del órgano altera o desnaturaliza las substancias albuminóideas que son el soporte de los fermentos; es necesario llevar a cabo aquella operación a baja temperatura. En cambio, otras veces es ventajoso dejar expontáneamente durante algún tiempo la primera materia para que se

autolice, con lo cual se destruyen o transforman muchos de los principios inmediatos que acompañan al fermento. La trituración con arena del tejido u órgano es operación previa muy conveniente porque rompe las membranas celulares y permite la salida del contenido de las células, el cual puede luego ser fácilmente extraído con disolventes; se aplica esto principalmente a los vegetales.

Preparado, por cualquiera de las manipulaciones antedichas, el líquido extractivo que contiene el fermento, se llega a la purificación, concentración y (a veces) extracción de ésta, por dos clases de métodos usados corriente e indistintamente en los laboratorios. Uno de ellos es el seguido por los investigadores norteamericanos preferentemente; se fundamenta en la aplicación sucesiva de diversos disolventes seguida de la precipitación por diversos reactivos o por adición a saturación de sales alcalinas. Intervienen en el proceso operatorio muchas variantes y factores: Temperatura, concentración de hidrógeno-iones, dialisis, etc. Hemos ya visto cómo por estos métodos se han conseguido obtener muchas diastasas cristalizadas. La desecación de los fermentos obtenidos es operación que necesita muchas precauciones; puede hacerse por evaporación expontánea, con corriente de aire seco y caliente o por acción de acetona anhidra; para la ureasa y para las lipasas va muy bien este último procedimiento; en cambio la desecación a vacío hace perder la mitad de su actividad a la *Renina* (*Lab*).

El otro grupo de métodos ha sido establecido por WILLSTAETTER y se ha generalizado extraordinariamente, no tan solo para obtener diastasas, sino también Vitaminas, Hormonas, Carotenoides, Antocianinas y Clorofilas y otros muchos cuerpos activos que se encuentran en muy pequeñas cantidades, tanto en las plantas como en los animales. El fundamento de los métodos consiste en adsorber el principio por una determinada substancia (adsorbente) con lo cual se le separa de las otras muchas que le acompañan y que no son adsorbibles en las condiciones en que se opera; el *adsorbato* producido (combinación de adsorción del fermento con el adsorbente) se descompone mediante un nuevo cuerpo o disolución que se lleva al fermento y deja libre (para regenerarla y volverla a utilizar) al adsorbente; a esta descomposición del producto de adsorción se la denomina *elucción* y al líquido empleado, *eluyente*. Los adsorbentes más usados son la alúmina (hidrato alumínico), el caolín, la tierra de batán, la franconita, el kiesel-

gur, el yeso, el carbonato cálcico precipitado, el óxido magnésico, la bauxita, el carbonato de plomo, la sacarosa y el carbón animal; los eluyentes son casi siempre álcalis diluídos o fosfatos alcalinos que tienen una afinidad un poco mayor para el adsorbente que para el fermento. Las operaciones alternativas de adsorción y elución pueden repetirse cambiando a veces el valor de P_H del medio; y de ese modo se consigue purificar al fermento, concentrarlo y separarlo incluso de otros fermentos que le acompañan. WILLSTAETTER ha establecido distintas clases de alúmina que se diferencian por su diverso comportamiento frente a los álcalis y los ácidos; son todas ellas coloides de diverso grado de dispersión o tamaño de la micela:

Alúmina A. — Obtenida por precipitación con amoníaco concentrado y a ebullición prolongada.—Muy plástica.

Alúmina B. — Obtenida como la anterior pero sin ebullición prolongada.—Plástica.

Alúmina C. — Obtenida por precipitación con amoníaco diluído y ebullición no prolongada.—Pulverulenta y de grano fino.

Alúmina D. — Obtenida por precipitación mediante ácido carbónico de la disolución de un aluminato.—De grano grueso.

Algunos ejemplos de aplicación de estos métodos consideramos de conveniencia consignar aquí para hacer resaltar su utilidad e importancia. WALDSCHMIDT-LEITZ los ha empleado para la separación de la mezcla de proteasas del páncreas: Proteinasa, Protaminasa, Carboxipolipeptidasa, Aminopolipeptidasa, Prolinasa y Dipeptidasa. Se trata el jugo pancreático purificado con alúmina C (una variedad de ella) a un P_H igual a cuatro; se adsorben las tres últimas y quedan en el líquido las tres primeras; eluyendo con álcali quedan aquéllas en libertad y adsorbiendo ahora con ridrato férrico coloide a $P_H = 4$ se absorben solamente la Aminopolipeptidasa y la Dipeptidasa, quedando en el líquido la Prolinasa; finalmente se separan las dos adsorbidas porque únicamente la Dipeptidasa es susceptible de eluirse. En cuanto se refiere a las tres otras diastasas que quedaron en el líquido tratado por alúmina C se vuelven a tratar con este mismo adsorbente pero a $P_H = 7$; la Carboxipolipeptidasa es la única adsorbida y se aisla luego por elucción del adsorbato.

Por estos procedimientos, y repitiendo las operaciones de adsorción y elucción, se consiguen preparados diastásicos de gran concentración y, por lo tanto, de extraordinaria actividad. Con relación a la diastasa bruta primitiva se ha logrado por WILLSTAETTER una *Sacarasa* 20.000 veces más activa; por SUMNER una *Ureasa* de semilla de soja 730 veces más activa, y por WILLSTAETTER y BAMANN una Lipasa gástrica 600 veces más activa. Este mismo Maestro llega a obtener una *Sacarasa* capaz de transformar por segundo seis veces su peso de sacarasa; y SUMNER una *Ureasa* de 130.000 unidades (véase más adelante), en tanto que la primitiva no tenía más que 7 unidades.

Por un método análogo se logran separar los tres Fermentos principales del páncreas: *Lipasa, Amilasa* y *Tripsina.* se adsorbe el extracto acuoso de la glándula con alúmina, la cual no actúa más que sobre la *Lipasa;* eluyendo el adsorbato con fosfato diamónico en medio glicérico diluído se logra separar *lipasa* casi pura; se purifica repitiendo el tratamiento. La mezcla de *Tripsina* y *Amilasa* (que no han sido adsorbidas por la alúmina), se tratan con Kaolín, que adsorbe solamente a la primera; en el líquido queda la amilasa impura, a la cual se añade alcohol hasta un 50% y se trata nuevamente con alúmina que ahora la adsorbe.

VOOD purifica *Tripsina* adsorbiendo la solución de la impura con papel de filtro; se deja secar al adsorbato en corriente de aire caliente; si las tiras secas de ese papel se introducen en agua, la Tripsina se disuelve al cabo de 20 minutos y las impurezas quedan retenidas en el papel.

Los métodos de adsorción y elucción han tenido modernamente una nueva aplicación para la *separación* y aislamiento de las Diastasas que se encuentren naturalmente mezcladas. Nos referimos al método de adsorción de TSWETT, llamado corrientemente *método cromatográfico.* Está fundado en hacer pasar la mezcla de substancias a través del adsorbente en polvo colocado en un tubo vertical apoyado por la parte inferior en un matraz; la substancia adsorbida queda retenida a su paso por la columna de adsorbente y las no adsorbidas pasan intactas al matraz inferior. El método se llamó cromatográfico porque se aplicó primitivamente a la separación de materias colorantes naturales (clorofilas, carotenoides, etc.) Como ejemplo de aplicación vamos a citar la separación de la *Cocimasa* (*Codehidrasa I*) con la *Codehidrasa II* (que

coexisten en la levadura de cerveza) según EULER y ADLER. Estando en disolución acuosa y empleando como adsorbente el óxido alumínico preparada por BROCKMAN, la *Codehidrasa* II queda retenida en la parte superior de la columna, en tanto que la I pasa a través del adsorbente y filtra en el matraz inferior. La técnica operatoria es la siguiente: 100 mgs. de un buen preparado que contenga las dos diastasas, se disuelven en 10 c. c. de agua; se filtra y el líquido filtrado se pasa por la columna (tubo de 0 7 cms. de diámetro y 8 cms. de largo) cargada de óxido alumínico; después de la percolación se añaden por la parte superior del tubo 15 c. c. de agua y se une el matraz con trompa o conducción de vacío practicando succión suave; se continúa el lavado con nuevas porciones de agua (en total 94 c. c.) para recoger en el matraz 100 c. c. entre filtrado primitivo y aguas de lavado; la operación dura dos horas. Se continúa la filtración a vacío para desecar toda la columna de adsorbente y se extrae luego éste del interior del tubo. Solamente el tercio superior de la columna contiene adsorbida a la *Codehidrasa* II; el resto inferior y los líquidos filtrados están desprovistos de ella; la capa que la retiene se distingue por su fluorescencia. Posteriormente se somete el adsorbato a un eluyente apropiado y se procede en el resto como hemos visto antes. El método no es más que de separación. Puede aplicarse también a la purificación de la propia Cocimasa; y a la separación en la emulsina de la β-*Glucosidasa* con la α-*Galactosidasa*, empleando bauxita como absorbente y operando a un $P_H = 4'7$. Otros ejemplos pueden encontrarse en el libro especial de ZECHMEISTER, publicado el pasado año.

* * *

Otro medio particular e interesantísimo de obtener Fermentos químicamente puros, es la síntesis de aquellos cuya estructura molecular es perfectamente conocida. Así pueden lograrse la Cocarboxilasa, las dos Codehidrogenasas I y II, el Fermento amarillo de WARBURG, etc. Al ocuparnos detalladamente de cada uno de ellos explicaremos los procedimientos sintéticos utilizados.

UNIDADES

Para poder apreciar, en la práctica de los procedimientos antedichos, la progresiva concentración de la Diastasa, ha sido preciso

establecer algunas *Unidades de actividad,* lo cual no siempre es posible. WILLSTAETTER y KUHN definen la Unidad encimática como la cantidad de fermento necesaria para producir un cambio químico definido. *Valor encimático* es el número de unidades contenidas en una cantidad definida de substancia. Claro es que estas medidas suponen una exacta proporcionalidad entre la velocidad de la reacción y la concentración del Fermento, es decir, una exacta aplicación de la ley de GULDBERG y WAAGE o de acción de las masas, a las reacciones encimáticas, lo cual no es rigurosamente exacto, como vimos anteriormente.

A continuación citamos algunas unidades que se consignan en el libro de AMMON y DIRSCHERL:

Dipeptidasa.—La unidad de *Erepsina* establecida primeramente por WILLSTAETTER y GRASSMANN (1926) era la cantidad de Fermento que hidroliza en una hora y a $P_H = 7'8$ a la mitad del substrato peptídico. Posteriormente GRASSMANN estableció la *Di-E* (unidad dipeptidásica) definiéndola como la cantidad de Dipeptidasa necesaria para hidrolizar en una hora y a 40 grados 10 c. c. de disolución 6/5 milomolar de dextro-levo-leucil-glicina, de forma que se necesiten luego 1'5 c. c. de disolución N/5 de KOH para neutralizar el producto de la hidrolisis. En cambio WALDSCHMIDT-LEITZ y DEUTSCH (1927), establece la L-Er-E (unidad Lienoerepsina) que es la cantidad de ésta necesaria para hidrolizar el 20% de 1/1.000 de mol de dextro-levo-leucil-glicina a un $P_H = 8'0$ y en un minuto.

Histidasa.—EDLBACHER y KRAUS (1930) consideran como unidad histidásica la cantidad de Fermento necesaria para liberar en seis horas 8 c. c. de amoníaco N/50, del substrato (histidina) sobre el cual actúa.

Lipasa - Esterasa - Fosfatasa. — WILLSTAETTER, WALDSCHMIDT-LEITZ y MEMMEN (1923) establecen la unidad de Lipasa como la cantidad de ella necesaria para hidrolizar en una hora y a 30 grados el 24% de 2'5 grs. de aceite de oliva (de 185'5 de índice de saponificación) empleando 13 c. c. de volumen de líquido en el cual hay 2 c. c. de solución reguladora NH_3-NH_4Cl de $P_H = 8'5$, y 10 mgs. de Cl_2Ca y 15 mgs. de albúmina, como activadores. También definen otra unidad lipásica que es la cantidad de lipasa necesaria para reducir a 20 el número de gotas dadas al estalagmómetro por una disolución saturada de tributirina cuando el fermento ha

actuado sobre este substrato durante 50 minutos a un $P_H = 8'6$. Unidad de esterasa es la cantidad de ella necesaria para hidrolizar el 25% de butirato de metilo presente cuando actúa sobre él durante 60 minutos a un $P_H = 8'9$. Unidad de Fosfatasa es, según ALBERS (1935) la cantidad de fermento capaz de separar una décima de milígramo de fósforo de un β Glicerofosfato cuando actúa sobre él a 35 grados y $P_H = 9$ durante una hora y en presencia de ión Magnesio en concentración 0'001 a 0'006 molar.

Peroxidasa.—La unidad establecida por WILLSTAETTER y POLLINGER es la 100/X ava parte de la Diastasa que es necesaria para producir x miligramos de Purpurogalina cuando actúa sobre una disolución de 5 grs. de Pirogalol y 50 mgs. peróxido de hidrógeno en dos litros de agua a 20 grados y durante 5 minutos; x debe oscilar entre 25 y 15.

Pepsina.—La Escuela de NORTHROP (1932) ha establecido diversas unidades. Una de ellas es la cantidad necesaria que, al actuar sobre 6 c. c. de una disolución de proteína al 5% a 35'5 grados y $P_H = 2'5$, determina un aumento de producción de carboxilo COOH de un miliequivalente por minuto (recognoscible por valoración con formol). ANSON y MIRSKY (1932) consideran como Hemoglobina-Pepsina unidad a la cantidad de diastasa que actuando sobre 6 c. c. de una disolución tipo de Hemoglobina durante un minuto y 35'5 grados, es capaz de digerir este pigmento de forma que dé un miliequivalente de tirosina determinada colorimétricamente en la disolución desalbuminada con ácido tricloroacético después de transcurrido el minuto.

Sacarasa.—La unidad establecida por WILLSTAETTER y KUHN (1923) es la cantidad necesaria para conseguir la rápida desaparición del poder rotatorio (reduciéndolo a 0 grados) de una disolución de 4 grs. de sacarosa en 25 c. c. de disolución de fosfato monosódico al 1%; es decir, cuando el 75'75% del substrato presente ha sido invertido. H. V. EULER establece la *actividad catalítica* de un preparado de sacarasa mediante la constante de inversión K, la cual se determina en una disolución de sacarosa de composición conocida; se utiliza la fórmula $K = \frac{1}{t} \log \frac{R + L}{\alpha + L}$ en la cual R es la rotación primitiva, L la final y la observada al cabo del tiempo t. Según EULER y SVANBERG (1919), la *capacidad de inversión* If de un preparado de Sacarasa viene dada por la fórmula:

— If $= \frac{K \times \text{gr. de azúcar}}{\text{gr. substancia seca}}$. WEIDENHAGEN (1932) considera la unidad de β-l-Fructuosa que es igual a 8'3 unidades de sacarosa según WILLSTAETTER.

Tripsina.—Se han establecido diferentes unidades para este Fermento. Según WILLSTAETTER y PERSIEL (1925) la Tripsina-Unidad *T*-(*e*) es la cantidad necesaria para producir un aumento de acidez equivalente a 2 c. c. de disolución 0'2 normal de hidrato potásico en las siguientes condiciones: Tratamiento a 37 grados durante 30 minutos, con enteroquinasa; substrato, 0'75 gr. de gelatina; volumen, 12 c. c. que contienen 2 c. c. de disolución reguladora normal de NH_3-NH_4-Cl en proporción 1:2; digestión durante 20 minutos; temperatura 37 grados. Para la Tripsina cristalizada que no necesita el concurso de la Enterokinasa, la Escuela de NORTHROP (1932) considera una unidad fundada en la variación de la viscosidad específica del substrato por la acción del Fermento.

Ureasa.—Según SUMNER, la unidad es la cantidad que se precisa para producir un mg. de nitrógeno amoniacal cuando actúa sobre una disolución de urea a 20 grados a un $P_H' = 7'0$ y durante 5 minutos.

METODOS DE DOSADO

Los métodos de determinación cuantitativa de los preparados diastásicos están fundados en las definiciones que anteriormente se han consignado para las unidades de su actividad y, virtualmente quedan reseñados al definir éstas. Las técnicas operatorias de valoración de preparados diastásicos (pepsina, tripsina, p. e.) de uso terapéutico se consignan en los Códigos de medicamentos o Farmacopeas de los distintos países; son fácilmente asequibles y por esa razón no los consignamos aquí. Haremos, tan solo, mención de aquellos especiales y representativos que se utilizan en los Laboratorios.

Amilasa.—Método de WILLSTAETTER y SCHUDEL al hipoiodito. La hidrolisis de 0'25 gr. de almidón soluble disuelto en 37 c. c. de agua, a la temperatura de 37° por la amilasa del páncreas, se consigue en un 40%. Suponiendo que la reacción es monomolecu-

lar, el cálculo de la actividad de la diastasa se hace utilizando la fórmula:

$$K = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a-x}$$

siendo t el tiempo, a la concentración primitiva del substrato, K las unidades de amilasa y x la cantidad de maltosa formada y determinada por el método al hipoiodito según esta reacción química:

$$CH_2OH\text{-}(CHOH)_4\text{-}COH + I_2 + 3NaOH = CH_2OH\text{-}(CHOH)_4\text{-}COONa + 2INa + 2H_2O$$

Para a no se toma el valor efectivo de 0,25 gr., sino el práctico que es el 75% de él o sea 0,1875 gr. Es conveniente tomar una cantidad de preparado diastásico tal que el valor de K quede entre los límites 0,001 y 0.03. La unidad de la amilasa es el céntuplo de la cantidad de Fermento necesaria para que K sea igual a 0,01; por eso ya directamente K da la actividad del fermento en esas unidades.

En un frasco cilíndrico de tapón esmerilado y de 50 c. c. de capacidad, se introducen 25 c. c. de disolución acuosa reciente al 1% de almidón soluble (marca KAHLBAUM), 10 c. c. de disolución reguladora 0,2 normal de fosfato (formada por 5,1 c. c. de disolución 0,2 normal de fosfato monopotásico y 4,9 c. c. de disolución 0,2 normal de fosfato disódico) de un $P_H = 6,8$ y 1 c. c. de disolución 0,2 normal de cloruro sódico (para activar la diastasa): se agita bien y se introduce en un termostato a 37°. Se introduce la diastasa, bien en polvo seco o bien tomando 1 c. c. de su disolución; se agita bien y se deja estar durante 10 minutos, al cabo de los cuales se añaden 2 c. c. de ácido clorhídrico normal para detener la reacción. Se pasa todo el contenido del frasco a un matraz Erlenmeyer, se lava con agua y se vierte ésta en el matraz; se agregan 0,6 c. c. de disolución N/10. de iodo y luego gota a gota disolución N/10 de NaOH hasta que se neutralice el ácido clorhídrico, se pase el fosfato ácido a dimetálico y quede un excedente que sea en volumen vez y media el del líquido. Después de 15 minutos se acidifica con ácido sulfúrico diluído y se determina el iodo excedente con disolución N/10 de hiposulfito sódico.

Ejemplo: Un c. c. de extracto glicérico de páncreas se disuelve en 250 c. c. de agua; se toman 0,8 c. c. de esta disolución y se opera con el almidón soluble en las condiciones antedichas durante 10 minutos. Se gastan 2,29 c. c. de disolución de iodo N/10. Un ensayo de control con el almidón y la diastasa solos consumen 0,53 c. c. de iodo N/10. De la cantidad de éste gastada en realidad (2,29-0,53 = 1,76 c. c.) se calcula la maltosa formada, que es de 30,2 miligramos y se deduce la constante de reacción:

$$K = \frac{1}{10} \log_{10} \frac{0{,}1875}{0{,}1875\text{-}0{,}0302} = 0{,}0076$$

es decir que la substancia ensayada tiene 0,0076 unidades de amilasa. Para deducir el grado de pureza de un preparado de amilasa, se expresa el número de unidades por decigramo de substancia.

Si se trata de amilasa de malta se prescinde de la activación con cloruro sódico y se trabaja a un $P_H = 5{,}6$.

Esterasa.—Método estalagmométrico de WILLSTAETTER y MEMMEN. Los esteres de ácidos grasos de escaso número de átomos de carbono, hacen descender considerablemente la tensión superficial de los líquidos acuosos en tanto que no tienen esa propiedad los productos de su hidrolisis; por eso son substancias muy adecuadas como substratos para determinar el poder saponificante de las diastasas. Se utiliza preferentemente la tributirina en presencia de actividades (una mezcla de albúmina, oleato cálcico y cloruro cálcico en exceso). La variación de tensión superficial se mide con un cuenta gotas. Se necesitan: 1º La disolución del Fermento (sangre, suero, extracto de órgano, jugo gástrico filtrado).—2º Solución saturada de tributirina; 50 gr. de la comercial se lava por agitación fuerte durante once veces con 400 c. c. de agua cada vez; se deja reposar y se toma con pipeta 20 gotas de tributirina que se vierten en un litro de agua y se agita fuertemente durante 1-2 horas, dejando luego en reposo por 24 horas; se filtra por filtro húmedo y se desprecian las primeras porciones filtradas recogiendo las intermedias.—3º Albúmina de huevo.—4º Disolución de Cl_2Ca al 2%.—5º Disolución de oleato sódico al 2%.—6º Solución reguladora formada por una parte de amoníaco 2,5 normal + 8 partes de cloruro amónico 2,5 normal; $P_H = 8{,}6$ a 18 grados. Se debe emplear una cantidad de Fermento que dé entre el doble y el quinto de una unidad de butirasa.

Se mezcla la cantidad apropiada del preparado diastásico con 30 mg. de albúmina (0,5-1 c. c. de su disolución) 0,5 c. c. de la disolución de cloruro cálcico (10 mg.), 56 c. c. de la disolución saturada de tributirina, 2 c. c. de la reguladora de $ClNH_4$-NH_3 y 0,5 c. c. de la de oleato sódico de modo que se tengan 60 c. c. de volumen total de líquido. Se determina el número de gotas que caen por minuto de este líquido mediante la pipeta de DUCLAUX o el estalagmómetro de OSTWALD, o una simple pipeta bien contrastada, que esté lleno del flúido anterior; o mejor, se mide el número de gotas que da el líquido que está en la parte de pipeta comprendida entre dos señales (2 c. c.) La pipeta ha de estar en baño de agua o en termostato a 20°. La operación se repite cada 20 minutos y se lleva a cabo también con agua pura y con disolu-

ción pura de tributirina. Se construye una curva por puntos en papel cuadriculado tomando como abscisas el número de gotas que da el volumen de líquido comprendido entre las dos marcas y como ordenadas los tiempos a los cuales se hace la determinación (0-20'-40'-60', etc.). La curva expresa la marcha de la actividad de la diastasa porque el número de gotas es proporcional a la tensión superficial.

La unidad de lipasa es la cantidad que se necesita de ella para hacer bajar el número de gotas en 50 minutos a 20; es decir, aproximadamente a la mitad de la diferencia entre el número de gotas que da la tributirina sola y el agua destilada sola.

Tripsina.—Método de R. WILLSTAETTER y otros para determinar la actividad trípsica. El método se fundamenta en la máxima actividad de la Proteinasa en presencia de la Enterokinasa, la cual necesita algún tiempo de contacto y se establece 30 minutos a 30°. Como substrato se emplea caseína, la cual se hidroliza rápida y fácilmente; el P_H óptimo es 8,9 y la solución reguladora es la ya conocida de $ClNH_4$—NH_3. La acidez final se mide en disolución con 90% de alcohol. Se necesitan, por lo tanto, las siguientes disoluciones: 1ª De hidrato potásico N/20 normal en alcohol de 90°. —2ª De timolptaleina, como indicador, al 0,5% en alcohol.

Se emplea un extracto glicérico de páncreas seco al 10%, el cual se diluye en 10 volúmenes de agua inmediatamente antes de la determinación. 1 c. c. de este líquido (o una cantidad equivalente de otra disolución o de preparado seco) se coloca en un frasco con tapón esmerilado, y se añaden 0,3 c. c. de una disolución de Enterokinasa que contenga aproximadamente 1 mg. de ésta, y 1-2 c. c. de agua; se agita y se deja estar durante 30 minutos a 30°; se agregan luego 5 c. c. de disolución de caseína al 6% (se suspenden 6 gr. de caseína pura en 100 c. c. de agua con 6 c. c. de amoníaco normal) y 2 c. c. de la disolución reguladora normal de NH_3–$ClNH_4$ (1:1) con lo cual se consigue un $PH_H = 8'9$ a 30°. Después de 20 minutos se añaden 5 c. c. de agua y 15 c. c. de alcohol absoluto y se vierte todo en un Erlenmeyer de 250 c. c. agregando 2 c. c. de la disolución de timolptaleina. Se dosa con disolución alcohólica 0'2 normal de KOH hasta coloración débilmente azul; entonces se agregan 120 c. c. de alcohol absoluto hirviendo y se continúa el dosado hasta aparición de color verde azulado. Como unidad de tripsina (T-e) se entiende la cantidad que se necesita de ésta para producir una hidrolisis que luego gaste 1'05 c. c. de la disolución 0,2 normal de hidrato potásico.

Dipeptidasa.—El método para determinar su actividad es también debido a WILLSTAETTER y muy parecido al anterior empleando como substrato la dextrolevo-leucilglicina, la cual se usa en disolución obtenida del modo siguiente: 9'4 gr. de la substancia se colocan en matraz de 250 c. c. con unos 180 c. c. de agua y 12'5 c. c.

de amoníaco 2'5 normal; se agita fuertemente y se calienta gradualmente hasta 55°, consiguiéndose disolución completa; se agregan entonces 41'5 c. c. de disolución N/3 de fosfato monopotásico y se completa con agua hasta 250 c. c.; se comprueba si el P_H del líquido es de 7'8 y si no se añaden algunas gotas de amoníaco o de solución de fosfato hasta conseguirlo. Las disoluciones alcohólicas de hidrato potásico y de timolptaleina son como las del método anterior.

Se colocan 3 c. c. de disolución del substrato (0,6 milimol de d-l-leucilglicina) en un matracito aforado de 5 c. c. previamente calentado a 40°; se añade la cantidad apropiada de la disolución de diastasa y se deja durante una hora a 40°; inmediatamente al fin de este tiempo se toma una prueba de 2 c. c. de líquido y se dosa acidimétricamente como en el método anterior con disolución N/20 alcohólica de KOH y timolptaleina. La unidad de Dipeptidasa (*Di-E*) es la cantidad de ella que hidroliza el 50% de la d-l-leucilglicina de una disolución (que contiene 112,8 mg. de esta substancia) en una hora y a 40°; corresponde a 1,3 c. c. de disolución N/20 de KOH alcohólica para una prueba de dosado de 2 c. c.

Aminopolipeptidasa.—El método de GRASSMANN y DYCKERHOFF utiliza como substrato un polipéptido que tenga grupos NH_2 no substituídos; el más apropiado es la d-l-leucilglicilglicina cuya disolución se hace con 3,06 gr. de este cuerpo, 4,8 c. c. de amoníaco N/25, 5 c. c. de solución reguladora de NH_3ClNH_4, 12,5 c. c. de la fosfato de $P_H = 7{,}0$ y el resto de agua hasta 50 c. c. La técnica operatoria es idéntica a la anterior: 2 c. c. de la disolución del substrato se colocan en un matracito aforado de 5 c. c., se agrega la de la diastasa, se completa con agua y se tiene una hora a 40°. El dosado acidimétrico se hace del mismo modo.

La unidad de polipeptidasa (Po-E) es el quíntuplo de la cantidad de fermento necesaria para hidrolizar el 50% de la d-l-leuciglicilglicina de los 2 c. c. de muestra (24,5 mgr.) en una hora y a 40°. Corresponde a 1 c. c. de disolución alcohólica N/20 de KOH.

Pepsina en el jugo gástrico.—Método de MICHAELIS. Se prepara una disolución tipo de pepsina disolviendo 5 gr. de ella pura (de GRUBLER) en 50 c. c. de disolución de ClNa al 10%; se filtra después de ocho días de contacto y se añade al filtrado un volumen igual de glicerina. Para un ensayo se toma 1 c. c. de este líquido y se diluye con agua hasta 100 c. c.

El substrato se prepara con suero de carnero en disolución al 1/15 en agua destilada; se le agrega poco a poco ácido sulfosalicílico al 10% hasta comienzo de viraje del papel rojo Congo a violeta.

Se preparan 6 tubos de ensayo en una gradilla. En el primero se coloca 1 c. c. de jugo gástrico y en cada uno de los cinco restante 1 c. c. de agua destilada; al segundo se le coloca ahora 1 c. c. de jugo gástrico mezclándolo con el agua que ya tenía el tubo; de esa mezcla se toma 1 c. c. que se pasa al tubo tercero y así sucesivamente; del último tubo se vierte 1 c. c. de su contenido; quedan finalmente todos los tubos con 1 c. c. de líquido y con una concentración respectiva de jugo gástrico 1/1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32. En un séptimo tubo de ensayo se vierte 1 c. c. de la solución tipo de pepsina. Se añade a cada uno de los 7 tubos 5 c. c. de la disolución de suero-ácido sulfosalicílico y se introducen todos en b. m. a 40°, vigilándolos hasta que el 7º se aclare de modo que pueda leerse a su través; entonces se observa a cuál otro tubo le sucede lo mismo y la concentración que tenga de jugo gástrico da el número de unidades de pepsina de éste; p. e. si es el tubo 4º, cuya concentración es 1/8, el jugo da 8 unidades de pepsina.

Tripsina por el método de METT.—Este método es muy conocido y de aplicación frecuente en la Clínica. Se preparan los llamados *tubos* de METT llenando tubitos de vidrio de 4-5 cm. de largo y de 1,5-2 mm. de diámetro (graduados en milímetros) de clara de huevo bien batida; la operación se facilita utilizando una trompa de vacio; ha de procurarse que no penetren burbujas de aire. Varios de estos tubitos así llenos se introducen en uno de ensayo y éste, a su vez, en b. m. a ebullición sosteniéndola durante 10 minutos; se extraen del tubo de ensayo y se limpian bien por fuera; cada uno contiene un coágulo blanco de albúmina de huevo.

En un frasco de fondo plano se coloca la solución de tripsina que hemos de valorar y se sumergen en ella 2-3 tubos de METT; se tapa el frasco y se deja en estufa a 37° durante 24 horas; se sacan entonces los tubos y se mide (con lupa y aproximación de medio milímetro) la columna de coágulo que se ha hidrolizado. El resultado se compara con el que dé una solución tipo de tripsina.

RELACIONES DE FERMENTOS ENTRE SI Y CON HORMONAS Y VITAMINAS

Con mucha frecuencia los fermentos actúan mezclados entre sí y las etapas diversas del metabolismo de los principios inmediatos se cumplen por la acción sucesiva de fermentos específicos que

se encuentran conjuntamente en un mismo órgano. Tal sucede con las Diastasas del páncreas: amilasa, lipasa y proteinasa; con las del hígado, con las de la sangre, etc. Aparte de esta coexistencia merece también mencionarse la de los Cofermentos que acompañan a las Diastasas y sin el concurso de lo cuales no es posible su acción, como ya vimos antes. Citemos también la posible transformación intraorgánica o la substitución de un fermento por otro como sucede con las esterasa y lipasa pancreáticas. EULER ha demostrado que la Codehidrogenasa I (Cocimasa) se transforma en Codehidrogenasa II (Coencima) por la acción de otra Diastasa que *no* es la Dihidrogenasa del ester de ROBINSON; es bien explicable esta transformación porque ambas Codehidrogenasas son Fosfopiridinonucleótidos; con *tres* moléculas de ácido fosfórico (TPN) la II y con *dos* moléculas (DPN) la I. A veces el mismo Agón o grupo activo de la Diastasa puede fijarse sobre distintos *Ferones* o soportes albuminoides coloidales para dar *simplexos* distintos, pero de la misma especificidad; tal sucede con las lipasas gástrica, pancreática, hepática, hemática, etc.; o con las Amilasas o Proteasas de esos mismos órganos (KRAUT). Existen también casos en que un fermento actúa sobre otro; pueden liberarse las Endo-Diastasas del interior celular por la acción de fermentos amilolíticos o proteolíticos (WILLSTAETTER); la liberación de la Sacarasa de las células de levadura es un ejemplo típico. La acción de un fermento sobre otro puede manifestarse en el ataque del soporte del segundo por el primero, quedando intacto su grupo activo; tal sucede con la ureasa cristalizada que actúa sobre otros fermentos.

En donde puede apreciarse más claramente la correlación entre distintos fermentos y la solidaridad estrecha que existe entre ellos, es en las funciones digestivas; y por lo tanto en el aparato gastrointestinal. Los carbohidratos alimenticios ingeridos comienzan a hidrolizarse por la acción de la Amilasa salivar; pasan luego intactos por el estómago y reciben luego el influjo decisivo de las amilasas del páncreas y del jugo intestinal que los desdobla hasta los términos de glucosa, fructosa, galactosa y pentosas; todos estos monosacáridos son quemados o utilizados para la síntesis de materias diversas en el interior del organismo y mediante la acción insustituible de las Diastasas. Las grasas comienzan a hidrolizarse en el estómago pero en muy pequeña proporción porque la Lipasa gástrica, como todas las Lipasas, apenas si actúa en medio ácido; el

BIBLIOTECA DEL COLEGIO DE

desdoblamiento principal tiene lugar en el intestino delgado y con el concurso de la Lipasa del páncreas; los ácidos grasos liberados de este modo, son reabsorbidos lo mismo que la glicerina; y una buena parte de las grasas es sintetizada inmediatamente a beneficio de la reversibilidad de la acción de las Lipasas; los ácidos grasos no empleados en esta síntesis son oxidados progresivamente (β—oxidación de KNOOP, ω—oxidación de VERKADE) con el concurso de diversas dehidrasas. En cuanto se refiere a las Proteínas la hidrolisis progresiva tiene lugar mediante la acción de Diastasas diversas y conduce a cuerpos sucesivamente más sencillos hasta llegar al final de amino-ácidos; en el estómago actúa la pepsina en medio ácido (la rennina o Fermento-Lab sirve principalmente para la coagulación de la leche y para su comienzo de hidrolisis) y las Proteínas se cambian en Peptonas que son de arquitectura molecular mucho más sencillas que las de aquéllas pero todavía bastante complicada; en el duodeno comienzan ya a actuar los otros fermentos proteolíticos; principalmente la Tripsina activada por la Enterokinasa (*Triptasas*) que desdobla a las Peptonas pasándolas a albumosas y a polipéptidos que son cuerpos mucho más sencillos; sobre ellos actúan las Peptidasas (*Ereptasas*) ya conocidas y que existen en el intestino: Dipeptidasa, Aminopolipeptidasa y Carboxipolipeptidasa; todo se resuelve finalmente en una mezcla de Amino-ácidos que son absorbidos y que se utilizan luego en parte para reconstruir nuestras propias albúminas; diez de estos 32 amino-ácidos son absolutamente indispensables y es necesario que existan en las Proteínas alimenticias porque nuestro organismo es incapaz, a lo que parece, de elaborarlas por síntesis intraorgánica: Triptófano, Histidina, y Fenilalanina, entre los cíclicos; Lisina, Leucina, Isoleucina, Treonina, Metionina, Valina, y Arginina entre los acíclicos (ROSE); nosotros no somos de esta opinión como ya demostramos hace tiempo (J. GIRAL).

La acción recíproca de Fermentos y Hormonas se manifiesta en muchos casos, algunos de los cuales vamos a considerar. La forma inactiva de la *Calicreína* (de Kalikreas Páncreas; Padutina; Angioxil) que es una hormona hipotensora, se logra activarla en la sangre por la presencia de Fermentos proteolíticos, especialmente Papaína. La existencia de Histidina en la orina de mujeres embarazadas la atribuye KAPELLER-ADLER a la insuficiencia de acción de Histidasa del hígado. La catalasa de la sangre y de los órga-

nos es activada considerablemente por la tirosina y disminuída en su acción por tiroidectomía; también la hormona tiroidea activa la acción de las Triptasas y Ereptasas así como las de todas las Dehidrasas u Oxidasas; no en valde se ha dicho que la glándula tiroide es el fuelle de las oxidaciones intraorgánicas; en cambio ejerce una acción paralizante sobre las Lipasas de diverso origen (Páncreas, Hígado, Placenta, etc.), quizá porque se une la Hormona al Fermento.

Una de las acciones más interesantes sobre Fermentos es la de la Insulina y recíprocamente. Precisamente la sensibilidad que tiene esta Hormona para las Proteasas es tan grande, que las dificultades primeras de su obtención radicaban en ella. Descomponen e inactivan a la Insulina, principalmente la Pepsina, la Papaína y la Catepsina; en cambio las Peptidasas apenas modifican la actividad de la hormona. Se ha supuesto que el motivo de la acción de estos Fermentos proteolíticos está en el ataque que hacen a la parte albuminoidea de la molécula de Insulina porque también se comportan aquellas Diastasas de modo idéntico con otras Proteohormonas tales como las de la Hipófisis y las de los corpúsculos epiteliales.

La Acetilcolina va acompañada siempre de Fermentos a los cuales posiblemente, más que a la Hormona misma, se deba su acción farmacológica; puesta en presencia de la colesterinasa esta Diastasa envenena definitivamente a la Hormona. En general las Hormonas pierden toda su eficacia cuando se administran por vía oral porque los fermentos digestivos las destruyen completamente; esto sucede p. e. con la Adrenalina y con la Insulina. Con la acetilcolina se llega hasta el extremo de ser muy activa en inyección intravenosa y muy poco si la inyección es subcutánea o intramuscular.

La influencia más extendida de Hormonas sobre Fermentos la encontramos en todo el proceso de la glucolisis y de la glucogenesis en el cual intervienen muchas Diastasas y bastantes Hormonas; en primer lugar la Insulina y luego la triada hormónica: Tiroideas, Hipofisarias y Cromafíricas (Adrenalina principalmente). La primera reduciendo el índice glucémico de la sangre y las segundas actuando en sentido contrario. Más adelante nos ocuparemos con detalle de estas influencias. Los ejemplos de acción recíproca de Fermentos y Vitaminas son también muy interesantes.

Algunos Fermentos tienen una constitución química muy parecida a la de ciertas Vitaminas y probablemente se originan *in vivo* a partir de ellas; así la Cocarboxilasa que es el ester difosfórico de la vitamina B_1 (Aneurina, Tiamina) unido a una proteína específica; el Fermento amarillo de Warburg que es un cromoproteído cuyo grupo prostético es un ester fosfórico de la flavina (es proteína + PO_4H_3 + Vitamina B_2) y se origina a partir de ésta por fosforilación mediante otro fermento, la Fosfatasa, con la colaboración de la Hormona suprarrenal. Es un caso típico de relación genética estrecha entre un Fermento (el amarillo), una Vitamina (la B_2) y una Hormona (la Adrenalina) con la colaboración de otro Fermento (la Fosfatasa).

Pero el caso de más extensa acción de una Vitamina sobre diversos Fermentos lo tenemos en la vitamina C o Acido ascórbico. Actúa sobre las Proteasas (Catepsina, Papaína, y Arginasa principalmente) deteniendo su actividad encimática por la intensa propiedad reductora que posee la Vitamina C, la cual es considerada como un transportador de hidrógeno y un catalizador en las óxido–reducciones intraorgánicas. También paraliza la acción de las Carbohidrasas especiales de la acción inhibidora del ácido de substancias reductoras impide esta acción inhibidora del ácido ascórbico sobre la amilolisis diastásica. Sobre la esterasa de la sangre ejerce una acción constructiva en el sentido de aumentar su cantidad por la inyección de Vitamina C; y hasta se supone que sea el progenitor o precursor de la parte activa (*Agón*) de esa esterasa. La misma acción ejerce sobre la Catalasa. Con los aminoácidos se comporta como una verdadera Aminoácidodesaminasa (catalizador de oxidación y de desaminación). Digamos también que esta vitamina C a su vez puede ser deshidrogenada y, por lo tanto, desactivada, por la acción de un Fermento (la *Acido–ascorbicoxidasa*) que se encuentra en ciertos tejidos vegetales; análoga acción ejercen ciertos microorganismos patógenos como el Bacilo paratífico B.

La Vitamina B_1 ejerce una decidida acción favorable a la secreción de Lipasa y de Tripsina pancreática. La A estimula la secreción gástrica principalmente la formación de ácido clorhídrico. La Vitamina D favorece, en cambio. la producción de catalasa sanguínea y de Fosfatasa muscular.

Aun debemos mencionar la acción de Fermentos sobre Pigmentos naturales; y muy especialmente sobre los respiratorios. En realidad la acción de unos y otros es conjunta y simultánea hasta el extremo de ser muy difícil la discriminación. El Citocromo, el Fermento amarillo, la Hemina–Fermento y aun la propia Catalasa son buen ejemplo de ello; Pigmentos y Diastasas deshidrogenantes a la vez. De su acción tendremos ocasión de ocuparnos extensamente más adelante. Añadamos todavía dos fermentos (la Carotinasa y la Clorofilasa) que tan decisiva influencia tienen sobre Pigmentos tan conocidos e importantes como son los Carotinoides y las Clorófilas.

Esta correlación y dependencia entre Fermentos, Hormonas y Vitaminas es actualmente objeto de estudio en laboratorios de investigación de muchos países. Y no es extraño que continuamente se descubran parentescos de estructura química y de génesis y herencia entre estas tres clases de compuestos.

APLICACIONES DE LOS FERMENTOS

La aplicación práctica más importante de las Diastasas está en la llamada "Industria de Fermentación". No existe ningún pueblo ni país (salvaje, bárbaro o civilizado) que no utilice en una u otra forma, y con primeras materias diversas, la Fermentación del azúcar para producir alcohol. El zumo de la uva, que tiene glucosa y levulosa, ambas fermentescibles, es una de las primeras materias empleadas desde los tiempos bíblicos; su transformación (por los propios fermentos que el mismo zumo de uva tiene) en alcohol y anhídrido carbónico que se desprende, determina el cambio del citado zumo en vino. El proceso es perfectamente conocido en la actualidad y en una de las últimas conferencias de este cursillo, nos ocuparemos extensamente de él; entonces veremos la extraordinaria complejidad de esta Fermentación alcohólica. En lugar del zumo de la uva pueden emplearse otras diversas primeras materias como son todas las féculas, que se hidrolizan primeramente por acción de ciertas Amilasas para transformarse en glucosa la cual fermenta después; las patatas, el arroz, el trigo, la cebada, el maíz, la tapioca, el casabe, el ñame, la pita, etc., pueden citarse, entre otras muchas materias amilaceas; las melazas de azúcar; y la propia celulosa y el serrín de madera se hidrolizan

también, aunque más difícil y lentamente, y los líquidos resultantes son fermentescibles. Es objeto ya de original explotación industrial, la madera para producir azúcar (glucosa), alcohol y glicerina utilizando en todos los procesos la acción insustituible de Diastasas diversas.

En otros casos el proceso de fermentación alcohólica tiene lugar sobre materias especiales y se logran las bebidas más diversas: Pulke, Chicha, Tecala, Arrak, Ron, etc. Compartiendo la importancia con el vino y superándola en muchos países, está la cerveza que es también producto de fermentación alcohólica de la glucosa producida en hidrolisis (por la maltasa) de la fécula de cebada germinada. Y aun podemos ciertos frutos cuyos zumos son también fermentescibles; tal p. e. el de la manzana que produce la sidra, el de la pera, ciruela, etc.

Las leches de ciertos animales son susceptibles de fermentar transformándose su lactosa en ácido láctico; tal es el origen del Kefir y del Kumys de las estepas rusas; y del yughurt búlgaro. El alcohol, a su vez, puede experimentar la fermentación ácida y transformarse en ácido acético; o el vino en vinagre que es lo mismo. Tiene también su importancia industrial.

Otro grupo importante de industrias de Fermentación es la Panadera. Las harinas utilizadas fermentan cuando se amasan con agua en presencia de Diastasas (Levaduras); fermenta la fécula de aquellas desprendiéndose anhídrido carbónico que hincha la masa y la hace porosa (pan); fermentan también las Proteínas constitutivas del Gluten de las harinas produciendo amino-ácidos y otros cuerpos. Los medios oxidantes favorecen las recciones diastásicas de la panificación; pero también los reductores como el ácido ascórbico o Vitamina C porque impide la actividad proteolítica dejando intacto el gluten en tanto que la fécula fermenta normalmente.

La acción de las Esterasas es también objeto de aplicación industrial. Como agentes lipolíticos que son, producen la hidrolisis de la materias grasas desdoblándolas en los ácidos grasos y la glicerina, que son sus componentes; los primeros utilizándolos para fabricar bujías; y unidos a álcalis para constituir jabones; la glicerina es de aplicaciones diversas y principalmente se emplea para nitrarla y obtener dinamita. La sola mención de estos nombres nos recuerda su importancia extraordinaria, la de las grasas gene-

radoras y la de las Diastasas que provocan su producción y su transformación. También se emplean preparados de Lipasas para aclarar y purificar las aguas residuales de lavado (de ropas, lanas, etc.). Las industrias textil, del papel y del curtido de pieles utilizan también procesos fermentativos; asimismo las de producción de ácido cítrico, jaleas y almidones.

He aquí algunos datos estadísticos tomados del excelente libro de K. BERHAUER (*Garungschemisches Praktikum.*—2ª edición) pupublicado este mismo año, y referentes a Alemania:

La *Fermentación alcohólica* industrial está valorada en total en *doce mil millones* de Marcos, de los cuales corresponden cinco mil ochocientos a los 200 millones de *cerveza* fabricados al año; cinco mil doscientos millones a los 200 millones de hectólitros elaborados de *vino*, y mil millones a los 20 millones de hectólitros de alcohol industrial para usos de calefacción, alumbrado y fuerza motriz. Como producto derivado de dicha fermentación está la *Glicerina*, de la cual se obtuvo (por Fermentación) más de *mil toneladas* durante la pasada guerra mundial.

La *Fermentación acetónica-Butanólica* produjo *diez mil toneladas* de Acetona y más de *cuarenta mil toneladas* de alcohol butílico al año (todos los datos son por año) con un valor de más de 60 millones de marcos oro; dichos líquidos son disolventes de nitrocelulosa y de lacas y se emplean para fabricar pólvoras plásticas y barnices.

La *Fermentación* acética produjo el 40% del total de ácido acético fabricado (otro 30% lo dió la destilación de la madera y 30% los métodos sintéticos) o sean 108.000 toneladas. Se utiliza como condimento y para fabricar esteres diversos que sirven para fabricar películas cinematográficas, lacas, etc.

La *Fermentación láctica* rindió 6,000 toneladas del ácido. Casi una cifra igual se produce en Norte-América. Se usa el ácido láctico en la industria textil y en la de pieles aparte de su empleo en preparados alimenticios y bebidas.

La *Fermentación cítrica* produjo 8,000 toneladas contra 5,000 en Norte-América; (usos farmacéuticos, industria de resinas artificiales, tintorería, etc.).

La *Levadura de cerveza prensada* para uso en panadería, etc., rindió 55,000 toneladas. La obtenida como residuo en la fabricación de cerveza y empleada como alimento de ganado, alcanzó la cifra de 100.000 toneladas (en seco).

La *Saponificación de grasas* mediante Esterasas es incalculable; solamente del aceite de Palma, hidrolizado por esterasa del recino, se beneficiaron 429 toneladas que produjeron 28,5 t. de glicerina, 410 t. de ácidos grasos y 33 t. de residuos diversos.

El empleo de Diastasas en los laboratorios tiene también ejemplos interesantes. Tal es el de la Ureasa, que sirve en análisis químico para las determinaciones cuantitativas de urea, sobre cuyo cuerpo actúa hidrolizándolo y transformándolo en carbonato

amónico (en anhídrido carbónico y amoníaco, en medio alcalino); el amoníaco producido se valora después volumétricamente. De modo análogo se utiliza la levadura de cerveza para determinar la cantidad de glucosa existente en una orina, midiendo el volumen de anhídrido carbónico desprendido en la fermentación de azúcar. Un método para la determinación del colágeno en los tejidos animales, está fundado en ser inatacable por la tripsina aquél, en tanto que estos son fácilmente proteolizados (y por tanto solubilizados) por la acción del citado fermento. En la práctica de desdoblamiento de muchos protéidos (núcleo y cromoprotéidos) por diastasas diversas está fundada la separación, aislamiento y purificación de muchos principios de gran interés bioquímico (ácidos nucléinicos, bases púricas, y pirimidínicas, grupos prostéticos cromáticos y cromógenos, etc.).

No menos interesante es la aplicación de los Fermentos para el diagnóstico clínico de ciertas enfermedades. Las oxidasas se encuentran en los mielocitos y también en los monocitos pero están ausentes en los linfocitos; los casos agudos de leucemia pueden diagnosticarse precisamente fundándose en la proporción en que se encuentran los mielocitos y los linfocitos en la sangre. La investigación de ésta en las heces, en la orina o en el contenido gástrico está fundada en la existencia de peroxidasa conjuntamente con la sangre; añadiendo a ella un peróxido (generalmente agua oxigenada) y una materia capaz de dar un colorante por la acción del oxígeno liberado al poner en contacto la peroxidasa y el peróxido (tintura de guayaco, bencidina, piramidón, etc.) se produce una coloración intensa generalmente azul. La reacción de ABDERHALDEN, para el diagnóstico precoz del embarazo está fundada en la existencia de fermentos de defensa en la sangre, como ya vimos anteriormente. La medición del poder diastásico (amilolítico) de la orina ayuda mucho para el diagnóstico de las enfermedades pancreáticas; la cifra normal de 64 unidades por c. c. de orina a 33° se encuentra considerablemente aumentada en las pancreatitis y muy especialmente en la necrosis pancreática. La Fosfatasa del suero de la sangre está muy fuertemente aumentada en el raquitismo. La determinación del poder diastásico de muchos fermentos es también un gran auxiliar en la clínica; citemos no más el de la pepsina gástrica y el de la Tripsina intestinal. En Histología son también de gran aplicación algunas reacciones diastási-

cas; la tan conocida de SCHULTZE, o reacción de las oxidasas tiene el mismo fundamento que la empleada para diagnosticar las leucemias; los leucocitos granulosos o los mielocitos contienen oxidasas, y puestos en presencia de una mezcla de parafenilenodiamina y de α—naftol se produce un indofenol blanco que pasa a azul por el oxígeno activo liberado por la oxidasa; se produce también la reacción con las células de las terminaciones nerviosas y con los músculos y puede llevarse a cabo con tejido fresco o en cortes por congelación o fijados con formol, porque la reacción no tiene carácter vital. El mismo fundamento tiene la reacción de KREIBICH variando solamente en el reactivo empleado que ahora es una solución de adrenalina, la cual se colorea en negro (de melanina) por el contacto de las granulaciones de las células eosinófilas, y en pardo con los leucocitos neutrófilos.

Las aplicaciones de fermentos en Terapéutica son bien conocidas, muy especialmente las de los gastrointestinales; todos ellos son Diastasas de origen animal. Pero también se emplean las vegetales como la Pepsina, Bromelina, Celulasa. De aplicación moderna podemos citar los preparados de Histaminasa para la curación de los estados alérgicos; la Lipasa hepática para la cirrosis del hígado. En Dermatología se emplean preparados de polvo seco de páncreas para la curación de forúnculos, exantemas y quemaduras. Citemos, finalmeste, el uso de Diastasas diversas (Maltasa, Takadiasa, Pancreatina) en la curación de la Diabetes; su acción hipoglucemiante es debida probablemente a ciertos cuerpos que la acompañan y que son de constitución parecida a la insulina.

PARTE DESCRIPTIVA

SISTEMATICA

La clasificación de los Fermentos aceptada generalmente es la debida a C. OPPENHEIMER, el gran tratadista alemán de estos cuerpos; la consignamos a continuación. Está fundada en la acción química que ejercen las Diastasas; con arreglo a ella, se dividen en dos grandes grupos: *Hidrolasas* y *Desmolasas*. Las primeras ejercen como su nombre indica, una acción hidrolítica sobre los cuerpos de los tres grupos fundamentales de principios inmediatos: Grasas (Lípidos), Carbohidratos (Glúcidos) y Albuminóides (Prótidos); el substrato está siempre, como se ve, formado por moléculas de largas cadenas las cuales se excinden por el proceso diastásico y el cuerpo se resuelve en otros más sencillos. En este gran grupo figuran todos los Fermentos que intervienen en la digestión de nuestros alimentos y la casi totalidad de los que tienen usos y aplicaciones industriales.

El grupo de las *Desmolasas* comprende a las Diastasas que ejercen una acción deshidrogenante u oxidante sobre substratos de sencilla arquitectura molecular procedentes en su mayoría de las hidrolisis llevadas a cabo por las Hidrolasas, y a los cuales transforman, en definitiva, en anhídrido carbónico y vapor de agua; pasando por cuerpos intermedios o no, según se trate de procesos anoxibióticos u oxibióticos.

Hemos querido conservar la clasificación tal y como la estableció su autor hace ya varios años. En la actualidad sería necesario retocarla añadiendo, entre las Esterasas, a la Colesterinasa y a las Lecitasas; a las Coencima y Codiastasa entre las Codehidrasas; al Fermento amarillo, al respiratorio y al citocromo entre las dehidrasas; creando el grupo de las aminoacidodehidrasas (Oxidodesaminasas) y el de las Diastasas de la glucolisis alcohólica y anerobia (Fosfatasas, Fosforilasas, Zimoexasa, Hemoquinasa, Oxisomerasas, Cacarboxilasa, Dismutasas, Glicolasa, Glixolasa). Fi-

nalmente debiera consignarse la única Diastasa de síntesis, la *Carboligasa* de NEUBERG, aunque su existencia sea discutida por algunos investigadores.

CLASIFICACION DE FERMENTOS SEGUN *C. OPPENHEIMER*

FERMENTOS	*HIDROLASAS*	*SUBSTRATO*
I.—ESTERASAS:		
Lipasas:		
Zoolipasas	.....	Grasas. — Esteres de ácidos grasos.
Fitolipasas	.....	
Fosfatasas	.....	Esteres fosfóricos. — Glicerofosfatos. — Nucleótidos.
Fitasa	.....	Fitina.
Sulfatasas (Complejo)	.....	Esteres sulfúricos.
Tanasa	.....	Tanino de tipo ester.
Clorofilasa	.....	Clorofila.
II.—CARBOHIDRASAS (Sacaridasas):		
Hexosidasas:		
α—Glucosidasas (Maltasa, Trehalasa)	.....	Maltosa. Trehalosa.
β—Glucosidasas (Celobiasa, Genciobiasa)	.....	Celo y Genciobiosas.
α—Galactosidasas (Melibiasa)		Melibiosa.
β—Galactosidasas (Lactasa)	..	Lactosa.
α—Manosidasa	.....	α—Manosidos.
β—Fructosidasa (Sucrasa. — (Sacarasa)	.....	β—Fructósidos.—Sacarosa.
Tioglucosidasa	.....	Glucósidos senevólicos.
Políasas (Polisacaridasas):		
Amilasas	.....	Almidón.
Celulasas	.....	Celulosa. — Liquenina.
Inulasa	.....	Inulina.
Xilanasa	.....	Xilana.
Pectinasa	.....	Pectina.
Nucleasas (Complejo)	.....	Acidos nuclénicos.
III.—AMIDASAS:		
Acidamidasas (Ureasa, Hipuricasa)	.....	Urea. — Derivados benzoilados de amino-ácidos.
Asparraguinasa	.....	Asparraguina.
Purinamidasas	.....	Adenina. — Guanina.
Arginasa	.....	Arginina.
Histidasa	.....	Histidina.
Fosfamidasas (Fosfatasas)	....	Fosfágeno.

FERMENTOS	*SUBSTRATO*

IV.—PROTEASAS:

Ereptasas: (Peptidasas):

Dipeptidasas	Dipéptidos (con NH_2 libre).
Aminopolipeptidasas	Polipéptidos Id.
Carboxipolipeptidasas	Polipéptidos (con COOH id.).
Prolinasa	Prolinopéptidos Id
Protaminasas	Protaminas.

Proteinasas:

Pepsinasas	Cation proteico.
Triptasas	Anion proteico.
Papainasas	Proteínas sin carga eléctrica
(Catepsina. — Papaína. — Proteasas de la levadura y de las semillas).	(en el punto isoeléctrico).

DESMOLASAS

I.—DEHIDRASAS:

Aldehidasas:

Acetaldehidasa	Hidrato de acetaldehido.
Metilglioxaldehidrasa	Hidrato de metilglioxal.
Glucolasa (de NEUBERG)	Hexosa-fosfatos.
Glucosadehidrasa	Hidrato de glucosa.
Alcoholdehidrasa:	Alcohol etílico.

Acidodehidrasas:

Sucinodehidrasa	Acido sucínico.
Malicodehidrasa	Acido málico.
Lácticodehidrasa	Acido láctico.
Citricodehidrasa	Acido cítrico.
Oxalicodehidrasa	Acido oxálico.
Oxibutiricodehidrasa	Acido β-Oxibutírico.
Acetodehidrasa	Acido acético.

Purinodehidrasas:

Xantinodehidrasa	Xantina.
Uricasa	Acido úrico.
Alantoinasa	Alantoína.

Fenoldehidrasas:

Tirosinasa	Tirosina.
Polifenoldehidrasa	Polifenoles.
Peroxidasas	Polifenoles con H_2O_2.

II.—OXIDASAS:

Hemina-Fermento de WARBURG.
Indofenoloxidasa de KEILIN.

III.—FERMENTOS ACCESORIOS DE LA DESMOLISIS:

Hidratasas:

Fumarasa	Acido fumárico.
Aldehidomutasa	Acetaldehido.
Cetoaldehidomutasa (Glioxalasa)	Metilglioxal.
Carboxilasas:	Acidos α-Cetónicos.
Catalasas:	Peróxido de hidrógeno.

IV.—CATALIZADORES INTERMEDIOS DE LA DESMOLISIS:

Activadores de la dislocación del azúcar:

Cozimasa: Acido adenílico, Mg. y Fosfato.

Transportadores de hidrógeno:

Tioles (Cistina, Glutation, etc.)
Substancias quinoides (Piocianina, Adrenalina, etc.)
Colorantes pirrólicos (Citocromo, Metahomoglobina).
Cuerpos derivados de azúcares (Acido escórbico, Metilglioxal).
Citoflavinas de SZENT-GYÖRGY.

Consideremos algunas de las de mayor interés, comenzando por las

HIDROLASAS

ESTERASA.—Son las que ejercen acción sobre los esteres en general, rompiendo el enlace R—CO—OR′ de sus moléculas, en presencia del agua, y regenerando el ácido R—COOH y el alcohol R′—OH que entraban a formarlos. En virtud de su reversibilidad pueden recomponer los esteres a partir del ácido y del alcohol; la acción, por lo tanto, conduce siempre a un equilibrio químico y es limitada; al ocuparnos de la reversibilidad de las acciones diastásicas, nos hemos referido principalmente a las esterasas porque son los Fermentos en donde se ofrece con más frecuencia e intensidad esta propiedad. También ofrecen una especificidad óptica, o mejor dicho estereoquímica, la cual depende de la existencia de carbonos asimétricos en la molécula del ácido integrante del ester; el caso no se da con las Lipasas corrientes porque los ácidos formadores de los esteres del substrato son los llamados ácidos grasos (de 12 a 18 átomos de carbono, saturados y de cadena lineal) que no poseen carbonos asimétricos. Pero puede ofrecerce con el ácido ricinoleico que es un ácido-alcohol o con aque-

llos que tienen doble enlace y poseen isomeria *cis* y *cis-trans* (oleico, linoleico, etc.); y también con las lecitinas (Lecitinasa) como veremos más adelante. En donde más se ha estudiado esta especificidad estereoquímica ha sido en los esteres del ácido mandélico:

$$C_6H_5—\underset{OH}{\overset{H}{C}}—COOH$$

habiéndose podido aislar los compuestos de adsorción de la levo-ester-esterasa y de la dextro-ester-esterasa a partir del ester mandélico racémico.

En general se reserva la denominación típica de Esterasas a las que hidrolizan a los esteres formados por alcoholes y ácidos de pequeño número de átomos de carbono (butirato de etilo p. e.) En cambio se llaman *Lipasas* a las que hidrolizan a las genuinas substancias grasas, que son mezclas de esteres de la glicerina formados por ácidos grasos que tienen de ordinario de 12 a 18 átomos de carbono; estas son las que se encuentran o vierten en el tubo intestinal humano. Las principales son la del hígado, la del páncreas y las de la sangre. La diferencia fundamental entre las dos primeras reside en su comportamiento frente a ciertas substancias consideradas como paralizantes de la acción diastásica y algunas de las cuales son agentes terapéuticos muy conocidos y empleados; he aquí un cuadro comparativo que lo demuestra:

	Atoxil	Quinina	Leucil-glicil-glicina	Tributirina	Butirato de metilo	Dextrolevo-mandelato de metilo
Lipasa pancreática	Resistente	Sensible	Activador	Fácil hidrolisis	Difícil hidrolisis	Producto de hidrolisis levogiro
Lipasa hepática	Sensible	Resistente	Sin influjo	Difícil hidrolisis	Fácil hidrolisis	Producto de hidrolisis dextrogiro

Las *Fosfatasas* actúan sobre muy diversos esteres fosfóricos, separándoles su ácido fosfórico; dichos esteres pueden ser muy variados: de la glicerina, de los azúcares, de la adenina, de la creatina, de los nucleótidos, de las lecitinas, de la fitina, etc. De ordinario se llaman simplemente *Fosfatasas* o *Hexofisfatasas* a las que

ejercen su acción sobre los esteres fosfóricos de los monosacáridos (Glucosa y Fructuosa principalmente), *Glicerofosfatasas* a las que lo hacen sobre los ácidos glicerofosfóricos, *Fosfatesas* o *Fosforilasas* a las que especialmente fosforilan o desfosforilan a los compuestos adenílicos del músculo transportando a la glucosa sus grupos fosfóricos (de ellas se conocen: simplemente Fosfatesas, Pirofosfatesas, Adenilpirofosfatesas, etc.); por su acción transportadora y reversible se dice que ejercen una "*Trans-esterificación*" y aun se distinguen entre ellas las *Heterofosfatesas* que activan el paso del resto fosfórico a la glucosa; se denominan *Lecitinasas* a las que actúan sobre Lecitinas, *Fitasa* a la que lo hace sobre la Fitina (sal cálcico-magnésica del ester fosfórico de la inosita); y *Nucleofosfatasas* las que hidrolizan a los Nucleótidos (PO_4H_3 + Pentosa + Basa púrica o pirimídica) separándoles su ácido fosfórico y reduciéndoles a nucleosidos. Todas las Fosfatasas se activan por el ion magnesio. A continuación consignamos un cuadro debido a KAY (1936) con un intento incompleto de clasificación de *Fosfatasas*.

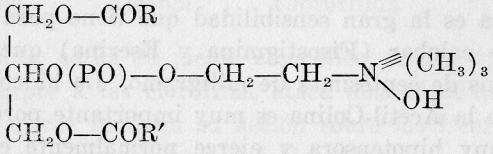
CLASE DE DIASTASA	SUBSTRATO HIDROLIZADO	EJEMPLO DE SUBSTRATO
Fosfomonoesterasa	Monoesteres del PO_4H_3 incluso los Nucleótidos: $R—O—PO(OH)_2$	Glicero, Fenil y Metil-fosfato. —Adenina-nucleótido.—Acido dihidroxiacetona-fosfórico.
Fosfodiesterasas	Diesteres del PO_4H_3 $(RO)_2\ PO(OH)$	Digliceril, Difenil, Dietilfosfato.
Pirofosfatasas	Diesteres y sales del $P_2O_7H_4$ $(RO)_2{=}(PO)_2O(OH)_2$	Difenilpirofosfato Pirofosfato sódico.
Metafosfatasa	Sales del PO_3H	Metafosfato sódico.
Fosfamidasas	Acidos aminofosfóricos sustituídos en N: $NHR—PO—(OH)_2$	Fosfocreatinas
Lecitinasa	Leticina, Cefalina, Lecitinas sintéticas, etc.	*Posible clasificación* Fosfodiesterasa
Fitasa	Fitina	Fosfomonoesterasa
Adenilpirofosfatasa	Adenilpirofosfato	Pirofosfatasa
Hexosadifosfatasa	Fermentación de Hexosadifosfato	Fosfomonoesterasa

La influencia del valor de P_H y del ion magnesio, se expresa por el mismo autor en el cuadro siguiente, exclusivamente de Fosfomonoesterasas:

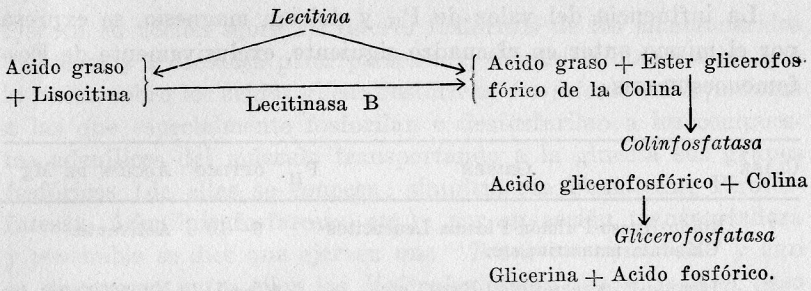
Clase	Origen	P_H óptimo	Acción de $Mg^{\cdot\cdot}$
1	Riñón-Hueso-Pulmón-Plasma-Leucocitos-Glándula mamaria, etc.	9—10	Activante
2	Hígado-Páncreas-Riñón-Bazo, etc.	4'5—5	No activante
3	Takadiastasa (vegetal)	3—4	Activa la hidrolisis de α-Glicerofosfato y paraliza la del β-Glicerofosfato
4	Eritrocitos del mamífero. Levadura?		Activante

Puede obsevarse la diferencia de valor de P_H debida principalmente a la influencia de las Proteasas (Pepsina, Tripsina) que generalmente acompañan a las Fosfomonoesterasas; y también el influjo característico del ion magnesio que es diferente en medio ácido (inhibente) que en medio alcalino (activante). Todas estas Fosfatasas son isodinámicas; y es curioso e interesante que la acción de muchas de ellas puede suplirse por la del hidrato de lántano (Bamann).

Las *Lecitinasas* o *Lecitasas* hidrolizan a las Lecitinas. Pero como éstas son de composición compleja, puede hacerse el desdoblamiento gradual con intervención de diferentes diastasas de esta clase. Los cuerpos integrantes de las Lecitinas normales son Glicerinas, Acidos grasos, Acido fosfórico y Colina:



y su hidrolisis diastásica puede representarse del modo siguiente según Belfanti (1936):



Las Lecitasas A y B son genuinas Lipasas; la A separa de la Lecitina solamente la molécula de ácido graso no saturado (Oleico) que contiene; el producto residual se llama *Lisocitina* y es también originado por la acción del veneno de serpiente cobra sobre la Lecitina; esta Lisocitina tiene un extraordinario poder hemolítico. La Lecitasa B actúa sobre ella, o directamente sobre la Lecitina, produciendo una hidrolisis más completa, con separación absoluta de las moléculas de ácidos grasos. Sobre el ester glicerofosfórico de la colina actúa luego la *Colinfosfatasa* desdoblándole en sus componentes; finalmente sobre el ácido glicerofosfórico así producido ejercen su acción las genuinas *Glicerofosfatasas* para escindirlos en glicerina y ácido fosfórico. Las otras Lecitinas (Esfingomielinas, Frenosina, Cefalina, etc.) se comportan de modo análogo.

La *Colinesterasa* es la Diastasa hidrolizante de los esteres de la Colina $(CH_3)_3 \equiv N(OH)—CH_2—O—R$ en donde R puede ser cualquiera de los radicales ácidos siguientes: Acético, propiónico, butírico, pirúvico, fosfórico, etc.); es de extraordinario interés bioquímico y se encuentra en la sangre, masa encefálica, músculo cardíaco y mucosa intestinal; es reversible en su acción y pueden, mediante ella, sintetizarse los esteres de la colina. Su propiedad característica es la gran sensibilidad que tiene para los alcaloides del haba de calabar (Fisostigmina y Eserina) que paralizan su acción a dosis de centésimas de miligramo. La hidrolisis que lleva a cabo sobre la Acetil-Colina es muy importante porque esta substancia es muy hipotensora y ejerce normalmente esta acción en nuestra economía.

La *Colesterinasa* forma parte de las Lipasas de la sangre y su acción es reguladora del equilibrio: Colesterina $\rightleftharpoons$ Ester. La Coles-

terina, que es un alcohol, existe libre y se esterifica con ácidos grasos en el organismo humano; estos esteres son hidrolizados por la citada diastasa pero también son formados con su concurso porque es de acción reversible. Tiene, por lo tanto, gran interés en el metabolismo colestérico.

Las *sulfatasas* hidrolizan a los esteres sulfúricos, que son muy numerosos y están muy repartidos en el organismo animal; son reversibles, y por lo tanto, sintetizantes, y no se activan sino que se inhiben por el ion magnésico. Constituyen un grupo homógeno, del cual distinguen, NEUBERG y sus colaboradores, las siguientes: La *Fenolsulfatasa* que actúa sobre los esteres sulfúricos de los fenoles; existe en todos los tejidos animales y también acompaña a la Takadiastasa del arroz. La *Condrosulfatasa* que libera el ácido sulfúrico de su unión con Carbohidratos en los Glucoprotéidos; no se ha encontrado más que en ciertas bacterias y es capaz de hidrolizar a los ácidos condroitinosulfúrico de los cartílagos y mucoidinosulfúrico de las mucinas produciendo ácido sulfúrico y condroitina o mucoidina, respectivamente. La *Mirosulfatasa* forma parte del sistema diastásico llamado Mirosina que existe conjuntamente con ciertos glucósidos sulfurados complejos como la Sinigrina o Mironato potásico; contribuye a la hidrolisis de éste en glucosa, alilsenevol y bisulfato potásico; también existe en la semilla de mostaza y en ciertos tejidos animales (músculo, hígado). Las Sulfatasas como es lógico intervienen activamente en el metabolismo de los compuestos de azufre.

La *Clorofilasa* no es propiamente una esterasa porque ejerce una alcohólisis (acción del alcohol y no del agua) más bien que una hidrolisis. Actúa sobre las clorofilas desdoblándolas en Fitol (que es su alcohol componente) y clorofilida:

$$\underset{\text{Clorofila}}{R—COOC_{20}H_{39}} + \underset{\text{Alcohol}}{C_2H_5OH} = \underset{\text{Clorofilida}}{R—COOC_2H_5} + \underset{\text{Fitol}}{C_{20}H_{39}OH}$$

Es reversible, actúa en medio alcohólico, su P_H óptimo es 5'9, acompaña siempre a las clorofilas, ataca más rápidamente a la *a* que a la *b* y ejerce también su acción sobre las Feofitinas *a* y *b* que ya no tienen magnesio como las clorofilas.

La *Tanasa* existe en ciertos hongos y también en la sangre, hígado e intestinos. Hidroliza a los Depsidos constitutivos de las

materias taníferas, que son derivados estéreos de ácidos fenolcarbónicos con glucosa. No solamente actúa sobre el tanino de la nuez de agalla (ácido galotánico), sino también sobre los quercitánico, cafetánico y quinotánico, típicos, respectivamente, de las cortezas de encima, del café y de la quina.

CARBOHIDRASAS.—Son los fermentos hidrolíticos de todos los sacáridos y pudieran por eso denominarse también *Sacaridasas.* En la clasificación adoptada se dividen en los grandes grupos de las *Hexosidasas,* que actúan sobre el enlace etéreo (de éter-óxido) de los Glucósidos y de los Di, Tri y Tetrasacáridos, y las *Poliasas* que hidrolizan a los Polisacáridos rompiendo las largas cadenas de sus moléculas. El primer grupo recibe también el nombre de *Olidasas* y se subdivide en *Holosidasas* cuyo substrato es un Holosido que no da por hidrólisis más que moléculas de Hexosa; y *Heterosidasa,* que actúa sobre los heterósidos desdoblándolos en hexosa o pentosa y otro cuerpo distinto. He aquí la modificación de clasificación introducida por el propio OPPENHEIMER:

CARBOHIDRASAS

Oligasas — *Poliasas*

Holosidasas

1.—Fructosidasas
2.—α-Glucosidasas
3.—β-Glucosidasas
4.—α-Manosidasas
5.—α-Galactosidasas
6.—β-Galactosidasas

Heterosidasas

1.—Hetero-Glucosidasas
2.—Hetero-biosidasas
3.—Pentosidasas con Ramnosidasas y Nucleosidasas
4.—Glucuronidasas
5.—Tioglucosidasas

1.—Amilasas
2.—Fructanasas
3.—β-Glucanasas
4.—Hemicelulasas
5.—Pectinasas
6.—Quitinasas

La reversibilidad de las *Carbohidrasas,* descubierta primeramente por CROFT HILL en 1898 en la Maltasa con el concurso de la Emulsina, ha sido luego comprobada por otros investigadores para este mismo caso; pero siempre es preciso la presencia de una Diastasas especial llamada primitivamente *Revertosa,* cuya constitución química no está todavía esclarecida. La síntesis de muchos Glucósidos con el concurso de la emulsina ha sido llevada a cabo por BOURQUELOT y sus colaboradores. La de la Lactosa con papi-

lla de glándula mamaria ha sido efectuada por MICHLIN y LEWITOW (1934). La de Sacarosa se ha logrado por los rusos OPARIN y KURSSANOW (1931) a partir de Glucosa y Fructosa, con un preparado diastásico en el cual existen Fosfatasas; lo cual comprueba los bien estudiados procesos de Glucolisis que consideraremos más adelante; es de todos modos muy discutida esta investigación de los químicos rusos. Citemos todavía la síntesis de Dextrinas de elevado peso molecular y que dan con el iodo color azul, conseguida por NISHIMURA (1930–1935) a partir de polisacáridos sencillos y con el auxilio de una Diastasas especial (*Amilosinteasa*) de ciertas levaduras. En realidad estas síntesis no son procesos de reversibilidad porque no es la misma Diastasa amilolítica, que escinde las complejas moléculas del almidón y de las dextrinas, la que interviene en la reconstrucción de esos Carbohidratos.

En cuanto se refiere a la especificidad de las Carbohidrasas, se cree modernamente que es muy relativa y que en realidad su número debe reducirse considerablemente, WEIDENHAGEN cree que no existe más que una sola α-*Glucosidasa* que actúa sobre todos los azúcares que tienen α-Glucosa (Piranosa): Maltosa, Sacarosa, Melizitosa, etc.; una β-*Glucosidasa* que lo hace sobre los sacáridos que tienen β-Glucosa: Genciobiosa, Celobiosa, Glucosidos-β); análogamente una β-*Fructosidasa* (Sacarosa, Rafinosa, Gencianosa) y dos *Galactosidasas*-α (Melibiosa, Rafinosa, Galactósidos-α) y β (Lactosa, Galactósidos β; en total solamente cinco *Hexosidasas.*

Entre las *Fructosidasas* (productoras de Fructosa a partir de los Disacáridos) figura como más importante la *Sacarasa* o *Invertasa,* de la cual nos hemos ocupado ya en diversas ocasiones (MYRBAECK); modernamente se ha probado que la sacarosa puede también hidrolizarse por dos fermentos, la α-*Glucosidasa* (que hidroliza también a la Maltosa) y la β-*Fructosidasa*; la *Sacarasa* animal es, verosímilmente, una α-*Glucosidasa*, en tanto que la de origen vegetal es una β-*Fructosidasa.* La Sacarasa se inactiva por las radiaciones ultravioleta pero la presencia del triftófano lo impide.

La *Maltosa* es otra α-*Glucosidasa* que hidroliza la Maltosa y la desdobla en dos moléculas de α-Glucosa. Existe en la malta fundamentalmente pero en estos últimos tiempos se ha descubierto también en los leucocitos de la sangre al estado de Endo, Desmo y Liodiastasa. Otras *Glucosidasas* interesantes son las que actúan sobre los Glucósidos de acción cardíaca y se denominan específica-

mente Digipuridasa, Estrofantobiasa, Escilarenasa; se encuentran en los vegetales respectivos y desdoblan progresivamente a los Glucósidos hasta dejar libre el *Aglucon* correspondiente.

Las *Glucosidasas* han adquirido nueva importancia después del descubrimiento de HOFFMAN (1936) de su existencia en diversos órganos animales (Hígado, Riñón, Mucosa intestinal). Merecen también citarse las siguientes *Glucosidasas*: *Trehalasa* cuyo substrato es la Trehalosa (Disacárido formado por dos moléculas de α-Glucosa), la *Rufinosa* que actúa sobre la Rafinosa (Trisacárido formado por Fructuosa), la *Gencianasa* que lo hace sobre la Gencianosa (Trisacarido formado por dos moléculas de Glucosa y una de Fructosa), la *Estaquiasa* cuyo substrato es la Estaquiosa (Tetrasacárido formado por dos moléculas de Galactosa, una de Fructosa y otra de Glucosa); la *Melicitasa* que ejerce su acción sobre la Melicitosa (Trisacarido formado por Turanosa y Glucosa o sea por dos moléculas de Glucosa y una de Fructosa); todas las anteriores son α-*Glucosidasas*. Entre las β pueden todavía citarse: *Celobiasa* que actúa sobre Celobiosa (Disacárido por dos moléculas de Glucosa), la *Genciobiasa* que lo hace sobre la Genciobiosa (Disacárido isómero del anterior), la *Linamarasa* o *Linasa* que hidroliza a la Linamarina (en ácido cianhídrico, acetona y glucosa), la *Vicianasa* que desdobla a la Vicianosa (en arabinosa, glucosa ácido cianhídrico y aldehido benzoico), la *Arbutasa* que lo hace sobre la Arbutina (en Hidroquinona y Glucosa), la *Salicasa* cuyo substrato es la Salicina a la cual hidroliza en Saligenina y Glucosa.—Añadamos todavía, entre las Galactosidasas, la *Lactasa,* que desdobla a la Lactosa en Glucosa y Galactosa, la *Melibiasa* que colabora a la acción de la Rafinasa, la *Primaverasa* que desdobla a la Primaverina en Primaverosa (una Xiloglucosa) y ester metoxiresorcílico, la *Isatasa* que descompone al Isatan, la *Indimulsina* que lo hace sobre el Indican hidrolizándole en Indoxilo y Glucosa, la *Eritrocina* cuyo substrato es el Acido ruberítrico que pasa a Alizarina y Glucosa (WEHMER).

Digamos algunas palabras sobre la *Emulsina,* descubierta desde hace más de un siglo en la almendra amarga y productos similares. Es propiamente una β-*Glucosidasa* mezclada con otros fermentos hidrolíticos. Su actividad sobre el Glucósido de la almendra amarga, la Amigdalina, se produce en etapas sucesivas:

Amigdalina + H_2O ⟶ Glucosa + Glucósido-nitrilo mandélico
Glucósido-nitrilmandélico + H_2O ⟶ Glucosa + nitrilo mandélico
Nitrilo mandélico + H_2O ⟶ Acido cianhídrico + Aldehido benzóico.

Se suponía antes que la primera reacción era determinada por un Fermento especial llamado *"Amigdalasa"*, la segunda por otro denominado *"Prunasa"* y la tercera, por el denominado hoy *Oxinitrilasa* y cuya existencia independiente de la *Emulsina* está bien probada.

Entre las *Heterosidasas* merecen una mención especial las *Pentosidasas,* que liberan pentosa, por hidrolisis; a ellas pertenecen las *Nuclosidasas* que actúan sobre los Nucleósidos (unión de Pentosas y Base Púrica o Pirimídica) producidos al actuar las *Nucleofosfatasas,* como vimos antes, sobre los Nucleótidos constitutivos de los ácidos nucléinicos. El Nucleosido se resuelve en sus dos componentes. También deben citarse las *Tioglucosidasas* que, análogamente, complementan la acción de la Mirosulfatasa separando Glucosa de la sinigrina como ya vimos. Y aun las Glucuronidasas que liberan ácido Glucurónico de sus muchos compuestos de copulación. En el grupo de las *Poliasas,* las más interesantes son las *Amilasas,* que son las Diastasas hidrolíticas del Almidón. Este substrato es un producto de condensación de muchas moléculas de Glucosa (probablemente de estructura ciclopentánica o furanósica). Las Amilasas actúan sobre él produciendo toda una serie de cuerpos de hidrolisis: Amilo, Eritro y Acrodextrina; y Maltosa que se resuelve finalmente en dos moléculas de Glucosa. Se conocen con seguridad *dos* Amilasas, la α y la β que originan, respectivamente, las α y β-Maltosas. Tipo de las primeras es la Amilasa pancreática, que es propiamente una *Dextrinógeno-amilasa;* y de las segundas, la del malta que es una *Sacarogenoamilasa* (Kuhn-1935). Como en el almidón existe ácido fosfórico unido a las moléculas de glucosa integrante, en la Amilopectina más que en la Amilosa (Euler), interviene también en su hidrolisis una *Amilofosfatasa,* la cual libera ácido fosfórico de esos compuestos. (Waldschmidt-Leitz-1935); también se sospecha la existencia de otra Diastasa que inicia la acción amilolítica transformando el almidón en cuerpos solubles pero *no* reductores. Los activadores de la hidrolisis son todavía poco conocidos, a salvo de la *Amilokinasa* existente en las semillas feculentas. Todas las Ami-

lasas son Lio, Desmo y Endodiastasas, encontrándose, por lo tanto, en el interior de las células en los tres estados distintos que indican esas denominaciones; así sucede con las existentes en los eritrocitos (que todas son de la clase α); del extrato glicérico se separa la *Lio* por adición de acetona y las otras dos por la acción de la Papaína. La Amilasa de la saliva (*Plialina*) no existe en la de los animales carnívoros estrictos; en los otros se aumenta la producción introduciendo substancias tensoactivas, es decir, aumentadoras de la tensión superficial, como son los alcoholes de muchos átomos de carbono. En la orina (como en la sangre) existen amilasas cuya cantidad aumenta o disminuye en ciertos estados patológicos, por lo cual tienen gran interés clínico; en las pancreonecrosis agudas aumenta considerablemente la Amilasa urinaria, lo cual puede reconocerse fácilmente poniéndola durante algún tiempo en contacto con engrudo de almidón y reconociendo luego que éste ya no da coloración azul con el iodo. Pero puede hacerse una determinación cualitativa (como ya describimos en otro lugar); el valor en la orina normal es de 64 unidades por c. c. Esta cifra aumenta en las Pancreatitis y Necrosis pancreáticas, y en cambio disminuye en los casos en que baja la permeabilidad renal, como sucede en las Nefritis. Las determinaciones en sangre son mucho más difíciles; la acetilcolina aumenta considerablemente la cantidad de Amilasas en la sangre; disminuye considerablemente (hasta anulación) en ciertos casos de sífilis del sistema nervioso central (Marchionini). Sobre la acción de las Amilasas influyen favorablemente los iones Cl y (PO_4), la hematina y la glutathiona. Las Amilasas actúan sobre el Glucógeno de modo idéntico a como lo hacen sobre el almidón.

Las *Celulasas* actúan sobre la Celulosa, que es un complejo polisacárido, parecido al almidón, pero constituído por moléculas de β-Glucosa de anillo exagonal o piránico; su hidrolisis diastásica es también gradual hasta el término del disacárido celobiosa, el cual finalmente se resuelve en Glucosa por influencia de la β-Glucosidasa. La *Celulasa* se encuentra en las plantas (semillas de cereales, *Aspergillus Oryzae*, etc.) y también en ciertos animales (jugo intestinal de caracoles y orugas, etc.) No existe en el organismo humano, el cual es incapaz de digerir la celulosa. La *Inulasa* hidroliza a la Inulina, que es una especie de almidón existente en los tubérculos y raíces de muchas compuestas (Dalia, To-

pinambur, Batata, etc.); está constituída (y se resuelve por amilosis) por moléculas de Fructosa (estructura pentagonal o furánica); la máxima actividad de la *Inulasa* es a 55° y $P_H = 3'8$. La *Xilanasa* actúa sobre la Xilanosa que es una pentosana muy abundante en la paja de cereales, en la parte interna de la mazorca de maíz y en la madera de ciertos árboles como el cerezo y el haya roja; está formada por moléculas de la pentosa llamada xilosa (estructura exagonal o piranósica) y en ella se resuelve por la hidrolisis diastásica. La *Quitinasa* ejerce su acción sobre la Quitina, la cual forma parte del caparazón de los Artrópodos y se encuentra también en ciertos hongos y líquenes, siendo de constitución parecida a la de la Celulosa; por hidrolisis produce glucosamina (glucosa aminada) y ácido acético; la *Quitinasa* existe en el jugo digestivo del caracol. Análoga es la *Liquenasa* que hidroliza a la *Liquenina* (compuesto análogo a la celulosa existente en los líquenes) transformándola en moléculas de glucosa; el fermento se encuentra también en el caracol; y en el moho negro, en la malta y en muchos gérmenes de plantas (Trigo, Maíz, Espinaca, Judía, etc.)

Finalmente las Pectidasas tienen como substrato a las *Materias pécticas* las cuales existen en las frutas maduras, especialmente en las manzanas; el flavedo de la naranja está casi exclusivamente constituído por ellas y el fundamento de la elaboración de las jaleas comestibles de frutas es la producción de ellas. Hace unos años que se conoce la compleja constitución química de estos cuerpos; están formados (Ehrlich) por la l-arabinosa unida a la sal cálcico-magnésica del ácido péptico, el cual, a su vez, es capaz de desdoblarse en la l-arabinosa, d-galactosa, ácido acético, metanol y ácido pectólico; éste se desdobla finalmente en 4 moléculas de ácido d-galacturónico. Las peptidasas que intervienen en todo este proceso hidrolítico son la *Protopectidasa* (acción hidratante pero no hidrolítica), la *Pectasa* o *Pectolipasa* que liberan al ácido pectólico y la *Pectolasa* que hidroliza finalmente a éste. Las *Pectidasas* existen en el jugo intestinal del caracol, y asociadas a otras diastasas como las Amilasas, Emulsinas y Takadiastasas. Constitución análoga a las materias pécticas tienen las Algina de las algas, el agar-agar, las gomas y los mucílagos vegetales como hemos demostrado hace tiempo (J. Giral) pero sus fermentos hidrolíticos respectivos no han sido todavía aislados, aunque todos esos

cuerpos son desdoblados, más o menos difícilmente, por las Pectidasas y los materiales que las contienen.

ANIMASAS.—Su acción química consiste en la separación del enlace carbono-nitrógeno en moléculas de cuerpos diversos; según la estructura química de estos substratos, se dividen en dos grupos: *Carbaminasas,* o simplemente *Aminasas,* que ejercen acción sobre las aminas separando de las primarias R—NH_2 el grupo amínico al estado de amoníaco y de las secundarias R—NH—R′ el radical R o R′ de la amina primaria R — NH_2 o R′— NH_2 que queda; y *Acilamidasas* que actúan sobre las Amidas simples R—$CONH_2$ o substituídas R—CO—NHR′ liberando respectivamente NH_3 o amina primaria. A las *Aminasas* pertenecen las *Nucleinaminasas* o *Purinamidasas* que desaminan a los productos de desdoblamiento (bases púricas o primídicas) de los ácidos nucléinicos; la *Arginasa,* de acción específica sobre la Arginina, a la cual desdobla en Urea y Ornitina; y la *Histidasa* que hidroliza a la Histidina en Acido fórmico, ácido glutámico y amoníaco; entre las *Acilamidasas* figuran en primer lugar la *Ureasa,* que actúa específicamente sobre la Urea transformándola en carbonato amónico (o en $CO_2 + CH_3$); la *Asparaginasa,* que lo hace sobre la Asparagina hidrolizándola en ácido aspártico y amoníaco; y las *Acilasas* tales como la *Histocina* y la Hipuricasa. Vamos a considerar las más importantes de ellas.

Nucleinaminasas.—Hemos dicho en su lugar oportuno, que los ácidos nucléinicos (de las nucleínas de los núcleos celulares) están constituídos por asociación de nucleósidos; éstos, a su vez, están formados por la unión de:

PO_4H_3 — Pentosa (ribosa) — Base púrica o pirimídica.

las *Nucleofosfatasas* separan de ellos al ácido fosfórico, las *Nucleosidasas* escinden al resto liberando a la pentosa y a la base; y ahora las *Nucleaminasas* actúan sobre estas últimas separando NH_3 de ellas. Son estas bases la Adenina y la Guanina entre las púricas o xánticas; y la Citosina y el Uracilo entre las pirimídicas; por la acción de estas diastasas desaminantes se transforman respectivamente en Hipoxantinas, Xantina y Uracilo. Existen en el hígado y en el tejido muscular y son de manifiesta especificidad (*Adenasa, Guanasa, Citosasa*) y de gran importancia en el metabolismo de las nucleínas. Los productos finales que originan, son poste-

riormente oxidados por diversas dehidrasas, como veremos al ocuparnos de éstas.

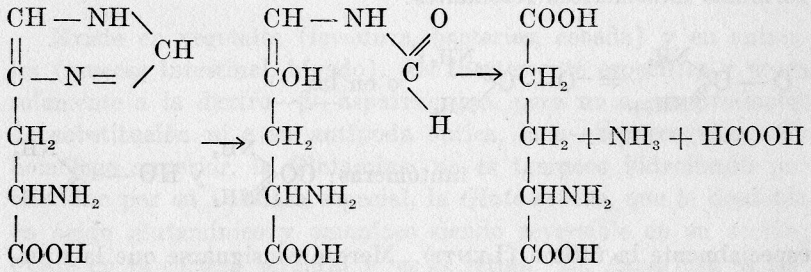
La *Arginasa* tiene una especificidad bien concreta; actúa solamente sobre la Arginina natural, que es el aminoácido dextrogiro; recientemente se ha observado que ataca al compuesto racémico si se opera a una concentración adecuada. Existe fundamentalmente en el hígado de mamíferos, pero también se encuentra en ciertos hongos; se distinguen las de los dos orígenes en que la vegetal se inactiva por dialisis a 0° durante unos días, en tanto que la hepática lo hace al cabo de algunas semanas (Edlbacher y Baur); ambas se reactivan por adición de iones metálicos (Co, Ni, Cd, V) pero especialmente con iones manganoso; de tal manera, que estos autores la consideran como un transportador de proteína con manganeso como coencima. Félix y Schneider afirman que no se atacan con Arginasa más que aquellos substratos que contienen guanidina libre (—NH—CNH—NH_2) y grupos carbóxilo (—COOH) como le ocurre a la arginina:

COOH—$CHNH_2$—CH_2—CH_2—CH_2—NH—CNH—NH_2 que se desdobla en ornitina y urea.

$$COOH—CHNH_2—CH_2—CH_2—CH_2—NH_2 + CO(NH_2)_2.$$

Los tumores y los tejidos necrosados son ricos en Arginasa.

La *Histidasa* actúa sobre otra base hexónica (ahora cíclica) que es la Histidina a la cual cambia en un producto intermedio el cual termina resolviéndose en amoníaco, ácido fórmico y ácido glutámico:



Se encuentra esta diastasa en el hígado de todos los mamíferos y tiene una marcada especificidad, pues no actúa más que so-

bre la Histamina levogira, que es el amino-ácido natural; no lo hace sobre compuestos de constitución muy parecida como el imidazol, el ácido imidazol-láctico o la metilhistidina. Modernamente ha adquirido especial importancia porque su substrato, la Histidina, se encuentra en la orina de embarazadas, entre los dos y los ocho meses de embarazo; en las hembras preñadas de diversos mamíferos (coneja, gata, perra, yegua) no se ha encontrado Histidina. Su presencia en la orina de las mujeres grávidas se debe a la influencia del prolano.

La *Histaminasa* (existe en el riñón) actúa sobre la Histamina (Histidina sin el grupo final COOH) desprendiéndole su NH_2 al estado de amoníaco pero respetando el núcleo imino-azólico.

La *Ureasa* ha sido ya considerada en otras ocasiones; es el Fermento específico de la urea a la cual hidroliza pasándola primero a carbonato amónico y luego (discutible) a carbonato amónico; finalmente estas sales se hidrolizan, espontáneamente y sin el concurso de diastasa, en anhídrido carbónico y amoníaco:

$$CO\langle^{NH_2}_{NH_2} + H_2O \longrightarrow CO\langle^{NH_2}_{O-NH_4} \longrightarrow CO\langle^{ONH_4}_{ONH_4} \longrightarrow$$

$$CO_2 + 2NH_3 + H_2O$$

La Diastasa necesita la presencia simultánea en el substrato de OH libre y de NH_2 libre; por eso la ureasa no actúa sobre las ureas substituídas tales como la metil-urea, la dimetil-urea simétrica, etc.; y por eso también se supone que la urea actúa en alguna de estas fórmulas mesoméricas resonantes:

$$-O-C\langle^{NH_2}_{NH_2+} \rightleftharpoons -O-C\langle^{NH_2+}_{NH_2}$$ o en las

tautómeras: $CO\langle^{NH_2}_{NH_2}$ y $HO-C\langle^{NH_2}_{NH}$

especialmente la última (Lenti). Merece consignarse que la ureasa cristalizada, obtenida por Sumner, se inactiva totalmente por la pepsina y la papaína. La Ureasa, tan específica, es de acción reversible y puede determinar la formación de urea a partir del

carbonato amónico (WILCOX, 1929). Se encuentra en muchos vegetales (especialmente en el haba de soja) en donde desempeña la función de producir NH_3 necesario para la síntesis de las albúminas. También se encuentra en el organismo animal, especialmente en el hígado, donde determina la síntesis de urea a partir del CO_2 y NH_3 que llegan a esa glándula como productos finales de la desmolisis de las albúminas y de sus amino-ácidos integrantes; actúa como enérgico activador de esta síntesis, la ornitina, la cual empieza fijando en su molécula el CO_2 y el NH_3 cambiándose en citrulina:

$$R - CH_2NH_2 + CO_2 + NH_3 = R - CH_2NH - CO - NH_2 + H_2O;$$

la citrulina fija una nueva molécula de amoníaco y pasa a arginina:

$$R - CH_2NH - C(NH)NH_2$$

la cual por hidratación se desdobla en ornitina y urea, como vimos antes al hablar de la Arginasa. La ureasa es extraordinariamente tóxica; 0,5 mmg. por vía intravenosa produce la muerte de un conejo de peso medio; pero se puede inmunizar al animal por inyecciones a dosis refractas, porque entonces se produce en su organismo un antifermento. La toxicidad es debida a la fuerte formación de amoníaco en la sangre y en los tejidos.

La *Asparraginasa* es Diastasa especifica de la Asparraguina a la cual hidroliza y desdobla en ácido aspártico y amoníaco.

$$NH_2 - CO - CH_2 - COOH + H_2O = COOH - CH_2 - CHNH_2 - COOH + NH_3$$

Existe en vegetales (levadura, bacterias, cebada) y en animales (mucosa intestinal, hígado). Es fuertemente específica y ataca solamente a la dextro—β—asparraguina, pero no a sus productos de substitución ni a su antípoda óptica, la α—asparraguina. Su homólogo superior, la Glutamina, no es tampoco hidrolizado por ella sino por su Diastasa especial, la *Glutaminasa*, que le desdobla en ácido glutamínico y amoníaco siendo reversible en su acción; existe en la corteza cerebral y en la retina. La *Aspartasa* es fermento específico y reversible, que desprende amoníaco del ácido aspártico transformándolo en fumárico.

La *Histozima,* conocida de antiguo (SCHMIEDEBERG, 1881) en el riñón se llama actualmente *Hipuricasa* y actúa sobre el ácido hipúrico desdoblándole en el ácido benzoico y glicocola:

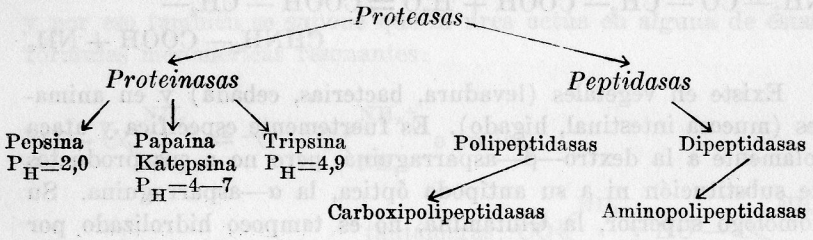
$$C_6H_5— CO — NH — CH_2— COOH + H_2O = C_6H_5— COOH + CH_2NH_2— COOH$$

No es específica pues desdobla análogamente a los homólogos del ácido hipúrico y también a los ácidos glicocólico y taurocólico; en cambio es muy específica estereoquímicamente pues hidroliza a todos estos ácidos naturales pero no a sus antípodas ópticos.

Finalmente deben incluirse, entre las Amidasas, a las *Fosfamidasas,* las cuales hidrolizan al ácido creatinfosfórico (*Fosfageno*) y al argininfosfórico separándoles el ácido mineral; esta acción la ejercen igualmente las Fosfatasas.

PROTEASAS. — Constituyen un considerable grupo de Diastasas hidrolíticas de Proteínas y de Polipéptidos; deshace la unión —CO — NH de sus moléculas produciendo ácidos y aminas: — CO — NH + H_2O = COOH + — NH_2 y ejercen también la acción reversible y sintética contraria.

La clasificación de estos fermentos, debida a GRASMANN (1932), comprende dos grandes familias: las *Proteinasas* que ejercen su acción sosbre las Proteínas o Albúminas o Prótidos; y las *Peptidasas,* que actúan solamente sobre los Péptidos originados en la hidrolisis producida por las anteriores. He aquí el esquema de esta clasificación:



OPPENHEIMER, como vimos en la clasificación general de los fermentos, considera al grupo de las Proteinasas en tres subgrupos, que son: Pepsinasas, Papainasas y Triptasas. Y en el de las Peptidasas, llamadas también Ereptasas, comprende, además de lo consignado en el cuadro anterior, la Proteinasa y las Protaminasas,

cuyos respectivos substratos son los Prolinopeptidos y las Protaminas.

Las diferencias fundamentales en el grupo de las Proteinasas consisten en el valor del P_H óptimo para su actividad; las Peptinasas actúan en medio muy ácido y separan el cation proteico, las Triptasas lo hacen en medio alcalino y sobre anion proteico, y las Papainasas actúan en medio débilmente ácido o neutro sobre albúminas en su punto isoeléctrico. Además estas últimas se activan por ácido cianhídrico, por ácido sulfhídrico y por compuestos con SH libre (glutathiona), en tanto que las demás no se activan por estos cuerpos; pero las Triptasas tienen un activador de naturaleza todavía desconocida, que es la Enterokinasa, en tanto que las peptinasas no tienen ninguno.

En cuanto se refiere a la especificidad de las Proteasas, ya nos ocupamos al tratar de esta propiedad en general; el nombre de los subgrupos de las Peptidasas indican con precisión los substratos específicos sobre los cuales actúan. Las Dipeptidasas no actúan más que sobre Dipeptidos (cuerpos formados por la unión de dos amino-ácidos) a los cuales hidrolizan desdoblándolos en sus dos amino ácidos componen

$$\begin{array}{l} R{-}CHNH_2{-}CO{-}O{-}NH{-}CH{-}COOH + H_2O = \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad R' \\ R{-}CHNH_2{-}COOH + R'{-}CHNH{-}COOH \end{array}$$

pero en ellas se da muy claramente la especificidad estereoquímica; y así p. e. hidrolizan a la Glicil-*levo*-leucina pero no atacan a la Glicin-*dextro*-leucina. Y esto sucede no solamente con las Dipeptidasas sino con todas las Proteinasas o Ereptasas; en presencia del compuesto racémico, lo desdoblan e hidrolizan luego al *levo* resultante dejando intacto al *dextro*; en general no son hidrolizables más que los Dipéptidos idénticos a los naturales. Las Polipeptidasas ejercen su acción sobre los polipéptidos constituídos por más de dos moléculas de amino-ácidos; la cadena del polipétido termina siempre en grupo NH_2 por un extremo y grupo COOH por el otro; las Polipeptidasas que separan al grupo NH_2 se llaman amino-polipeptidasas y las que separan el grupo —COOH son las Carboxipolipeptidasas; pero no son intercambiables y necesitan, además, para su actuación, que los dichos grupos funcionales

estén sin sustituir ni bloquear en la molécula del polipéptido. La separación de todas estas Peptidasas entre sí, mediante aplicación de adsorbentes diversos, ha sido ya considerada anteriormente.

La propiedad bioquímica de mayor interés de las Proteasas es su reversibilidad que permite la reconstrucción de las moléculas albuminoideas en el interior del organismo a partir de los aminoácidos liberados por la proteolisis diastásica. Ha podido practicarse experimentalmente esta síntesis. SAWJALOW (1901) pudo observar que las disoluciones de Peptona puestas en contacto con Pepsina depositan al cabo de algún tiempo un precipitado albuminoideo que se llamó *Plasteína* o *Coagulosa*. Aun más concluyente es la experiencia de BORSOOK y WASTENEYS (1931) que consiste en digerir albúmina de huevo con pepsina y concentrar después el líquido resultante, a vacío y a $P_H = 4—5$; se regenera la albúmina primitiva. Con la Tripsina es mucho más difícil el experimento y más dudosos los resultados. VOEGTLIN y sus colaboradores (1933) operan dejando autolizarse durante unas horas y en atmósfera de nitrógeno, una papilla de tejido animal; se introduce ahora oxígeno y se observa que el nitrógeno de los grupos amínicos disminuye en tanto que aumenta el albuminoideo, lo cual prueba el proceso de síntesis a partir del autolizado; se favorece esta síntesis por la presencia de grupos SH (Glutationa), de un P_H próximo a la neutralidad y de una cierta presión de oxígeno.

Nos ocuparemos ahora especialmente de algunas Proteasas, remitiendo siempre al lector al capítulo de Generalidades de Diastasas, en donde se tratan muchas propiedades de estos agentes proteolíticos.

La *Pepsina* es una Proteinasa típica de secreción que, como es sabido, existe en el jugo gástrico pero también en la mucosa del estómago acompañada de *Catepsina*, que no es una Diastasa (ANSON); OKAHARA (1930) ha encontrado una Pepsinasa en las *Drosera*, que son plantas cuyas flores digieren a las Albúminas. La Pepsina se une con Proteínas y el compuesto resultante se ha logrado cristalizar (como la pepsina aislada) siendo tan activo como ésta libre; del jugo gástrico se ha conseguido aislar y cristalizar una Gastroglobulina inactiva que tiene las mismas propiedades químicas que la Pepsina cristalizada de NORTHROP y que, posiblemente, es el soporte del ácido clorhídrico que activa la proteolisis. Pero modernamente (1937) han obtenido KRAUT y TRIA

una pepsina cristalizada absolutamente libre de albúmina, lo cual complica el problema de saber cuál es la constitución química de la Pepsina; si es o no una Proteína con un ácido polivalente fuerte que neutraliza a la mayor parte de los grupos amínicos de la albúmina sobre la cual actúa, como piensa GORTER. El *Pepsinógeno* ha sido aislado al estado cristalizado por HERRIOT; es inactivo como fermento y se distingue, además, de la Pepsina en su punto isoeléctrico (3'8 en vez de 2'7), estabilidad y proporción de nitrógeno amínico en la molécula; su paso a pepsina es un proceso autocatalítico en el cual aproximadamente nueve de los enlaces pépticos de su molécula albuminoidea se abren; este proceso no es específico.

La *Triptasa* o *Tripsina,* cuya fuente principal es el páncreas, existe también en los leucocitos; pero la primera no tiene ninguna actividad si no está combinada con la Quinasa intestinal en unión definida y reversible, en tanto que la leucocitaria (y también la Desmotriptasa insoluble del páncreas) son activas sin el concurso del citado Cofermento; a la Tripsina cristalizada la sucede también lo mismo. La Triptasa actúa a un $P_H = 7'8$, es decir, en un medio alcalino francamente; pero lo hace mucho más lento aunque más completo que la pepsina; ésta no llega en su Proteolisis más que a a la formación de Peptonas y Polipéptidos a lo sumo, en tanto que la *Tripsina* consigue separar algunos amino-ácidos de la molécula albuminoidea, siendo (y por este orden) liberados primeramente la Tirosina, el Triptófano, la Cistina y el ácido Glutámico. En punto a su constitución química se supone que esta Diastasa es un complejo de Proteína y una base polivalente. KUNITZ ha probado recientemente que las disoluciones acuosas de Quimotripsina (que cristaliza en romboedros o en prismas) dejadas algún tiempo a 5 grados y a un $P_H = 7'6$ a $8'6$ se transforman en una mezcla de tres Proteínas, las cuales cristalizan juntas en agujas; dos de ellas (la β y la γ Quimotripsina) son activas pero la tercera no lo es y todas difieren entre sí y con la primitiva Diastasa, en su forma cristalina, solubilidad, peso molecular y resistencia a los ácidos.

Las *Papainasas* (*Papaína, Proteinasas* de la Levadura, etc.) no comprenden a la *Catepsina* de los tejidos animales, porque ANSON ha demostrado recientemente que esta última no es una verdadera Diastasa, habiéndose creído lo contrario por las impurezas

que siempre la acompañan y a las cuales es debida en realidad la supuesta acción diastásica. Son Endoencimas celulares que se activan, como ya vimos, por los compuestos que tienen SH libre y también por el ácido cianhídrico, que en general ejerce acción contraria o paralizante de la actividad encimática. Fundándose en la activación antedicha y teniendo en cuenta que las formas oxidadas de esos tioles (Glutation, Cristina) no son activadores y únicamente las reducidas (grupos SH libres) lo son, se ha pensado que dicha activación es un proceso de reducción o de hidrogenación. La *Papaína* activada por los cuerpos dichos es inactiva en presencia de peróxido de hidrógeno, pero se regenera por adición de Glutation reducido. Okamura ha obtenido *Papaína* (del *Carica Papaya*) purísima, la cual da al análisis: C=48'46% y N=13'7%; parece una Proteína específica, pero no tiene grupos aldehido ni —S—S— ni —SH—; contrariamente a lo que han encontrado Frankel y sus colaboradores. La *Papaína* no desdobla a los Péptidos por el sitio próximo al NH libre y no necesita que el substrato tenga también carboxilo COOH libre; lo que precisa es otra unión péptica además de la que va a deshacer; la afinidad del Péptido para con la Diastasa dicha aumenta con la longitud de su cadena.

La *Bromelina* de la Piña de América es también muy parecida a la Papaína y se incluye, por lo tanto, en el grupo de las Papainasas. La *Ficina,* del *latex* del *Ficus* y que existe también en los higos comestibles, es muy parecida a la Papaína; se ha logrado cristalizar por Walti, contiene también grupos —SH— y se inactiva por H_2O_2; es antihelmínica y capaz de digerir y disolver totalmente a los gusanos parásitos del hombre (Berger).

El *Fermento Lab,* llamado también *Quimosina* y *Rennina,* existe en el jugo gástrico humano (principalmente en la primera edad de nuestro ser) y ejerce una acción coagulante sobre la leche, produciendo además una ligera y no bien estudiada transformación sobre la caseína coagulada. La *Quimotripsina* ha sido aislada del páncreas, así como su generador, el *Quimotripsinógeno,* al estado cristalino, por Northrop; no se activan por Enteroquinasa, sino por la propia Tripsina activa y actúan sobre la leche lo mismo que el Lab Fermento.

Entre las Proteinasas se acostumbra a clasificar también a la *Trombina,* que es el llamado agente diastásico de la coagulación

de la sangre y que parece estar constituída por un complejo de proteína y una lecitina (la cefalina); por su acción se llama también *coagulasa* y parece que existe en el plasma sanguíneo su generador, el *Trombogeno* o Protombina (llamado también *Plasmocima*) el cual se activa por la *Tromboquinasa* de los leucocitos y de las plaquetas (que no es más que cefalina); en presencia de iones calcio, la Trombina actúa sobre el Fibrinógeno del plasma sanguíneo y lo transforma en Fibrina coagulada insoluble; su acción química, por lo tanto, es la hidrolítica de desdoblar al Fibrinógeno en Fibrina y Seroglubulina; pero WOLISCH niega terminantemente que el fibrinógeno experimente ninguna transformación durante el proceso de coagulación de la sangre.

En realidad este proceso es mucho más complejo, e intervienen en él TRECE factores, de los cuales existen en el plasma los OCHO siguientes: Fibrinógeno, Protrombina (Trombógeno, Serozima), Antitrombina Antiprotrombina (Heparina), Lipoides, Calcio, Coagulasa (Fermento que se identifica con la Trombina) Vitamina K. En las plaquetas existen DOS factores: Tejido lipoide (Cefalina, Citozima, Tromboquinasa, Substancia tromboplástica: es una lecitina), y Tejido coagulante (Coagulina, Tejido fibrinógeno). En la sangre ya coagulada existen los TRES factores siguientes: Fibrina, Trombina (Trombasa, Fibrinofermento) y Metatrombina. —El tipo corriente de coagulación se explica por la acción de la Protrombina activada por la Vitamina K y los iones calcio, sobre el Fibrinógeno; el tejido lipoide o cefalina actúa solamente como neutralizante de la acción de la antitrombina y de la Antiprotrombina, cuyos factores son anticoagulantes. El resultado de la coagulación es la Fibrina juntamente con la trombina.—(J. H. FERGUSON).—Merece consignarse que según investigaciones de DYCKERHOFF, las sales de Neodimio impiden la coagulación de la sangre, lo cual es de gran interés para evitar los peligros de la Trombosis y evitar el Schock anafiláctico.

Los llamados *Fermentos de Defensa de Abderhalden* son de acción proteolítica, de estricta especificidad y se producen cuando se introducen en el organismo substancias albuminoideas por vía parenteral; existen en la sangre y ya nos ocupamos de ello al tratar de la conocida reacción de dicho autor para el diagnóstico precoz del embarazo, la cual ya se practica con la orina de la em-

barazada. El principio en que se funda se ha extendido para ciertas enfermedades, como la sífilis, el cáncer y los trastornos endócrinos, cuyos diagnósticos pueden establecerse hoy con seguridad fundados en la existencia en la sangre de estos fermentos defensivos.

Según ABDERHLDEN, todos ellos son específicos, actúan a un P_H óptimo $=7'3$ y se activan por adición de suero sanguíneo.

Las *Protaminasas* son Proteasas que actúan específicamente sobre los albuminoides más sencillos llamados Protaminas; éstos contienen una gran cantidad de las llamadas Bases hexónicas, Arginina, Histidina y Lisina; la función de la Protaminasa es la de liberar a estos amino-ácidos, especialmente a la Arginina, y se comporta realmente como una Carboxipolipeptidasa, habiéndose también comparado su acción a la de la Triptasa, aunque no se activan por ninguna Quinasa.

La *Prolinasa* de GRASSMANN (1932) actúa sobre los péptidos que contienen Prolina.—La *Dehidropeptidasa* de BERGMANN (1930) ejerce su acción sobre la Glicil-dehidrofenilalanina, desdoblándola en Glicocola, amoníaco y ácido fenilpirúvico; existe en el riñón y en el páncreas y es una propia Dipeptidasa. Citemos todavía entre las Proteasas a la *Gelatinasa* de NORTHROP que hidroliza a la gelatina; a la *Coagulasa* de HOBSON que existe en el jugo digestivo de las moscas de la carne y que proteoliza a las materias colágenas; y a la *Queratinasa* de la polilla que lo hace sobre las queratinas y que tiene tanto interés doméstico porque explica la acción destructora de ese insecto sobre los tejidos de lana.

DESMOLASAS

Este gran grupo de Diastasas se caracteriza por su acción química, completamente diferente de la que ejercen las *Hidrolasas*; estas últimas hidrolizan al substrato y lo desdoblan, pura y simplemente, en sus componentes. Las *Desmolasas* actúan ejerciendo transformaciones diversas sobre las substancias fermentescibles (Oxidaciones, reducciones, desaminaciones, descarboxilaciones); y en definitiva deshacen los enlaces existentes en sus moléculas, entre los átomos de carbono y los de otros elementos (oxígeno, nitró-

geno, hidrógeno); y aun entre un átomo de carbono y el siguiente rompiendo la cadena carbonada, que es el esqueleto de toda molécula orgánica. En general la *Desmolisis* es proceso subsiguiente a la *Hidrolisis* y las Diastasas que la determinan actúan sucesivamente sobre los productos del desdoblamiento hidrolítico hasta resolverlos finalmente en anhidrido carbónico y vapor de agua (amoníaco también en los nitrogenados). Esto sucede muy especialmente con las substancias alimenticias, las cuales se desdoblan por las Hidrolasas digestivas y después son absorbidos los cuerpos resultantes de este sencillo proceso químico; sobre ellos actúan luego las diversas desmolasas de nuestro organismo, y en las acciones que ejercen se funda casi todo el metabolismo intermedio y final, en cuyas fases toma su origen la energía (calorífica principalmente) necesaria para el funcionamiento de nuestro ser. Pero en el transcurso de todos esos procesos, debemos distinguir dos fases fundamentales dentro de las cuales se agrupan casi todos ellos; la una y primera es la *anoxibiótica* (llamada anteriormente *anaerobia* desde los tiempos de PASTEUR) que tiene lugar sin el auxilio, concurso ni intervención del oxígeno libre; la otra y siguiente, es la *Oxibiótica* (*Aerobia* de antes) que es una oxidación profunda llamada también *Respiración*, con el concurso del oxígeno atmosférico y que conduce a la substancia atacada hasta los términos finales de anhídrido carbónico y vapor de agua; esta segunda fase no tiene lugar más que sobre cuerpos de arquitectura química muy sencilla (alcohol, ácido láctico, etc.) producidos en la fase anaerobia.

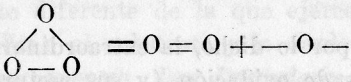
En los organismos anaerobios estrictos no tiene lugar esta segunda fase: pero en todos, sean anaerobios o aerobios, las *Desmolasas* son los agentes encargados de iniciar y acelerar las reacciones químicas correspondientes; y también de regularlas, antes de que intervengan las glándulas de secreción interna y el sistema nervioso.

Se comprende por lo dicho, la extraordinaria importancia que tienen los procesos de oxidación (y sus recíprocos de reducción) intraorgánica; y la conveniencia de que nos ocupemos de ellos antes de estudiar las distintas *Desmolasas*, que son en su mayoría oxidasas y Reductasas, directas o indirectas, principales o coadyuvantes.

OXIDACIONES Y REDUCCIONES INTRAORGANICAS

De antiguo llamó la atención el hecho notable de que las oxidaciones *in vivo* conducen a transformaciones intensas de las substancias orgánicas y organizadas, llegando hasta los productos finales tantas veces mencionados, sin que precisen los medios oxidantes violentos que se utilizan en los laboratorios. Para *quemar* glucosa totalmente, necesitamos en éstos emplear temperaturas elevadas, fuerte corriente de oxígeno o de aire, reactivos de oxidación enérgicos; para lograr el mismo resultado en los organismos no se pasa de su temperatura normal y todas las etapas del proceso transcurren con suavidad y lentitud pero con igual eficacia que *in vitro*. Pensaron entonces los investigadores en la intervención de elementos o factores que explicasen esta singular diferencia. En la actualidad no se ha logrado dar una satisfacción íntima y completa a nuestro espíritu aun a pesar de haberse ideado un considerable número de hipótesis y teorías, que no son más que fórmulas de acomodación de nuestro pensamiento a los hechos observados o experimentados. De algunas de ellas nos vamos a hacer eco a continuación.

Oxígeno activo.—Se pensó primeramente en la intervención de alguna forma especial del agente oxidante por antonomasia. El descubrimiento del ozono (por SCHÖNBEIN en 1845) hizo pensar en este trimero del oxígeno, como elemento determinante de dichas oxidaciones intraorgánicas. En efecto, el ozono tiene un gran potencial químico y un gran poder oxidante muy superior al oxígeno molecular, que es el existente en el aire atmosférico; resulta de la condensación del de este origen con absorción de calor el cual desprende al despolimerizarse su molécula; además, y en este acto libera *oxígeno atómico,* que es mucho más activo que el molecular:



Estos átomos libres de oxígeno juntamente con el calor desprendido en su producción a partir del ozono, explican satisfactoriamente la exaltada facultad oxidante de este último; y así p. e. libera Iodo del ioduro potásico, lo que no hace el oxígeno mole-

cular. Pero en cambio tampoco el ozono es capaz de oxidar al óxido de carbono CO para pasarlo a anhídrido carbónico CO_2; ni al nitrógeno para dar ácidos nitroso o nítrico. Es de notar que ya entonces hubo de observarse que estas últimas oxidaciones podía llevarlas a cabo el ozono en presencia del hidruro de paladio, que es un compuesto fuertemente reductor; con lo cual ya se entreveía que las oxidaciones son procesos químicos correlativos a las reducciones.

HOPPE-SEYLER insiste en la hipótesis del oxígeno atómico determinante de estas oxidaciones *in vivo* y explica el concurso, anterior y necesario, del hidrógeno admitiendo que este elemento actúa sobre el oxígeno molecular formando agua y liberando oxígeno atómico:

$$H_2 + (O = O) = H_2O + -O-$$

bien directamente, como se expresa en la anterior ecuación, o bien formándose antes peróxido de hidrógeno (agua oxigenada):

$$H_2 + (O = O) = HO - OH = H_2O + -O-$$

También se supone que el oxígeno molecular actúa simplemente con el agua para dar agua oxigenada y oxígeno activo; aquélla origina también y en definitiva a éste:

$$(O = O) + H_2O = OH - OH + -O- \ ;$$
$$OH - OH = H_2O + -O-$$

Pero todo ello no consigue explicar por qué se forma agua oxigenada (tóxica desde luego para las células donde se efectúan estas oxidaciones) y por qué se descompone este peróxido.

Autoxidadores.—ENGLER y TRAUBE admiten que el oxígeno molecular es capaz de fijarse sobre ciertos cuerpos a los cuales llaman autoxidantes o *Autoxidadores* para formar con ellos unos peróxidos inestables, los cuales ceden parte o todo su oxígeno (y en forma activa o atómica) a los cuerpos oxidables que se denominan *Aceptores,* con o sin la intervención del agua; el autoxidador así regenerado puede nuevamente transformarse en peróxido y éste ceder luego su oxígeno, y así indefinidamente; con lo cual una pequeñísima cantidad de autoxidante puede producir la oxidación de una gran masa de cuerpo oxidable actuando realmente como un catalizador de oxidación:

$$A + (O = O) = A\begin{cases} O \\ | \\ O \end{cases} \quad ; \quad A\begin{cases} O \\ | \\ O \end{cases} + B = \quad AO \quad + BO$$

Autoxidante — Peróxido — Aceptor — Oxido estable — Oxido estable

$$A\begin{cases} O \\ | \\ O \end{cases} + H_2O = A\begin{cases} O - OH \\ | \\ OH \end{cases} = AO + H_2O_2$$

Una experiencia típica de Job demuestra la existencia de estos cuerpos. El óxido ceroso Ce_2O_3 disuelto en carbonato potásico es un autoxidante *incoloro*; agitada su disolución en presencia del aire se colorea en *rojo* porque retiene oxígeno y forma un peróxido de este color que es el peróxido de cerio CeO_3 :

$$Ce_2O_3 + 3O = 2CeO_3$$

si entonces se añade al líquido un cuerpo reductor u oxidable, como un arsénito, el color pasa de rojo a *amarillo* porque el peróxido cede *parte* de su oxígeno y retrocede a óxido cérico CeO :

$$CeO_3 + AsO_3H_2 = CeO_2 + AsO_4H_2$$
$$A = O + B = AO + BO$$

pero si se emplea la glucosa como aceptor en vez del arsénito, el peróxido le cede todo su oxígeno y se regenera el autoxidante, óxido ceroso incoloro:

$$2\ CeO_3 + \text{Glucosa} = Ce_2O_3 + (\text{Glucosa} + O_3)$$

Se conocen muchos cuerpos autoxidantes, los cuales intervienen en diversas reacciones químicas de aplicaciones variadas. En primer lugar está el agua (o el mismo hidrógeno) que pasan a peróxido de hidrógeno y luego ceden su oxígeno; las sales manganosas y sus óxidos, que se emplean en Análisis químico con permanganato potásico en medio clorhídrico o sulfúrico (dosis de hierro, de materia orgánica en aguas, etc.); la esencia de trementina o aguarrás *antiguo,* que se usa para la reacción de Weber de investigación de sangre en heces, etc. A veces el autoxidante y el aceptor pueden ser una misma substancia en dos formas tautoméricas distintas.

Moureu y Dufraisse han probado que estas cesiones de oxígeno de los peróxidos al aceptor pueden evitarse con la interpo-

sición de otro cuerpo, llamado *Antioxígeno*, el cual es muy oxidable y toma el oxígeno del peróxido antes que lo haga la substancia aceptora; la hidroquinona y el pirogalol son antioxígenos típicos y se utilizan en la práctica para evitar la fácil oxidabilidad de la acroleina.

Sistema BACH-CHODAT.—Haciendo aplicación de la teoría anterior, suponen estos autores que en las células y tejidos animales se forman peróxidos, los cuales ceden su oxígeno activo al desdoblarse por la acción de unas diastasas, denominadas por ello peroxidasas. El sistema *Peróxido–Peroxidasa* constituye una oxidasa completa y se revela su existencia en las células añadiéndolas un reactivo fácilmente oxidable y que se transforme por la oxidación en un cuerpo coloreado. Este es el fundamento de la reacción de KREIBICH para descubrir las granulaciones de los mielocitos tiñendo los cortes de órganos con disolución de adrenalina al 1 por mil; esta hormona es un difenol:

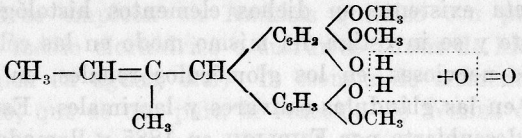
$$\begin{matrix} HO \\ HO \end{matrix}\!\!\rangle C_6H_3 - CHOH - CH_2 - NH - CH_3$$

y, por tanto, es un cuerpo fácilmente oxidable; con el oxígeno desprendido por la acción de la peroxidasa sobre el peróxido (ambos existentes en esas granulaciones) se oxida y forma cuerpos amarillo-pardos (con los leucocitos neutrófilos) o negros de melanina (con las células eosinófilas). Análoga es la reacción de SCHULTZE o de las oxidasas, tan empleadas en Histología para diferenciar estos mielocitos o los leucocitos granulosos, de las demás células; aquí el reactivo es una mezcla de parafenilenodiamina y α-naftol, la cual da un indofenol blanco que pasa a azul en presencia del oxígeno activo desprendido del sistema Peróxido-Peroxidasa u Oxidasa Completa existente en dichos elementos histológicos; como también existe y se investiga del mismo modo en las células de las terminaciones nerviosas, en los glomérulos renales, en el retículo endotelial, y en las glándulas salivares y lacrimales. Esta reacción es la misma descubierta por EHRLICH en 1885 y llamada corrientemente *Nadi*-reacción, con la sola variante de que este último utiliza la Dimetilpara-fenilenodiamina (o sea el derivado dimetilado) en lugar de la base sin substituir; de la primera sílaba de cada uno de los dos componentes que constituyen el reactivo se forma la

palabra *Nadi*; la oxidasa recibe entonces el nombre de *Indofenoloxidasa* y de ella nos ocuparemos especialmente más adelante.

La acción tan conocida e interesante, de la *Lacasa,* el fermento del latex del árbol de la laca, se explica de análogo modo; es una oxidasa que actúa sobre polifenoles allí existentes produciendo su ennegrecimiento y la formación de la verdadera laca, negra, brillante. Lo mismo podemos decir de la *Tirosinasa,* determinante de la producción de Melaninas a partir de la Tirosina (J. JIRAL). En muchos de estos casos, se defiende la presencia insustituible de un metal (manganeso principalmente) con lo cual se relaciona esta teoría con la de WARBURG, que expondremos a continuación.

Pero el propio BACH reconoce que en muchos tejidos no existe más que la Peroxidasa y falta el Peróxido; entonces el sistema es una Oxidasa indirecta o incompleta, y para reconocer su existencia es indispensable añadir un peróxido al reactivo cromógeno. Las tan conocidas reacciones de investigación de sangre en heces fecales, orina o jugo gástrico, para diagnosticar hemorragias internas, tienen su fundamento en la existencia de una peroxidasa en la sangre. Se emplea como peróxido el agua oxigenada o la esencia vieja de trementina; y como reactivo cromógeno, la tintura de guayaco o la bencidina; la conjunción de estos tres factores (Peroxidasa de la sangre, peróxido descomponible por la anterior liberando oxígeno atómico, y reactivo cromógeno oxidable por ese oxígeno para producir una materia colorante), determina la formación de un compuesto azul. En el caso de la bencidina: $NH_2—C_6H_4—C_6H_4—NH_2$ se origina una quinhidrona por oxidación de los núcleos benzénicos integrantes de su molécula; en el de la tintura de guayaco, el ácido guayacónico de ésta:



Acido guayacónico.

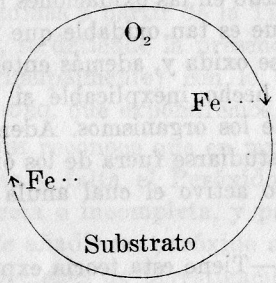
se transforma en un producto de oxidación azul, separándose dos hidrógenos oxhidrílicos, con un oxígeno para formar agua, y reemplazándolos otro oxígeno de la molécula de este gas.

Pero esta teoría de BACH-CHODAT tiene fuertes objecciones. Cuerpos muy facilmente oxidables *in vitro,* por el oxígeno molecular, no son oxidados en los tejidos por el oxígeno atómico que se desprende del peróxido; tal sucede con el fósforo el arsénico, el metanal, el ácido oxálico. La llamada degeneración grasa del hígado (degeneración, infiltración o lipofanerosis) en los casos de envenenamiento por el fósforo o el arsénico está precisamente caracterizada por un gran retardo en las oxidaciones intraorgánicas; y este metaloide, el fósforo, que es tan oxidable que no puede conservarse en el seno del aire, no se oxida y, además entorpece las otras oxidaciones en los tejidos; hecho inexplicable si existen oxidasas tan activas en el interior de los organismos. Además, las oxidasas que han podido aislarse y estudiarse fuera de los órganos son muy inestables frente al oxígeno activo el cual anula completamente toda su acción.

Teoría de Warburg.—Tiene esta teoría explicativa de las oxidaciones intraorgánicas su antecedente en la de G. BERTRAND, ideada para explicar la acción de la lacasa (antes mencionada) y en general de todos los fermentos llamados oxidasas; en las cenizas de todas las que han logrado aislarse existe siempre un metal al estado coloidal (manganeso o hierro principalmente); y se pensó que estos fermentos están constituídos por una parte orgánica asociada a un metal que actúa como catalizador de aquéllas. El hecho de que las sales manganosa produzcan en contacto del aire la oxidación de varios polifenoles, como ocurre con la hidroquinona; el que esta oxidación sea más rápida e intensa en presencia de un coloide como la gelatina o la albúmina; el que puedan obtenerse verdaderas oxidasas artificiales con un coloide y sales ferrosas; y el que en todos estos experimentos se manifieste una verdadera especificidad de la acción oxidante, que depende de la naturaleza de la sal metálica empleada, (cloruros, citratos, carbonatos, óxidos, etc.), son apoyos firmes de la intervención indispensable de un metal en las oxidaciones *in vivo;* en definitiva, se trata de fermentos metálicos que actúan sobre un soporte coloidal.

WARBURG amplió todos estos hechos y practicó nuevas experiencias. Contrariamente a lo que pensó LIEBIG (1843) no estimó que la Hemoglobina fuese un simple transportador del oxígeno atmosférico a los tejidos; pensó que también era un activador de ese oxígeno y que la función activamente radicaba en el hierro de aquel

pigmento y no era exclusiva de él sino que la compartían otros diversos (citocromos, fermento respiratorio) pigmentos ferruginosos que contenían aquel metal al estado de ion ferroso o divalente. El ciclo de su intervención se explicaba por el paso a trivalente en presencia de oxígeno molecular, cesión del oxígeno atomizado al substrato y retorno del hierro trivalente a bivalente para recomenzar su actuación:



Entre las experiencias clásicas que su autor ideó en defensa de su teoría están las oxidaciones *in vitro* practicadas en presencia de carbón de sangre (que tiene nitrógeno y hierro) y oxígeno del aire; así se logra oxidar, hasta el término final de anhídrico carbónico y vapor de agua a un cuerpo tan estable como el ácido oxálico:

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} + O = 2\,CO_2 + H_2O;$$

y así también se logra oxidar el azufre de la cistina hasta el término de ácido sulfúrico. Se admite que no solamente el hierro actúa como catalizador sino que en muchos casos es el nitrógeno el que desempeña este papel; y son compuestos nitrogenados, porfirinas diversas, las que se encargan de retener al óxido de carbono formando cuerpos totalmente inactivos para la respiración. Warburg insiste mucho en la acción propiamente superficial en el sentido de que el oxígeno se activa únicamente en la superficie del substrato que es donde se absorbe primeramente por este. Finalmente el hecho de impedirse todas estas oxidaciones en presencia de mínimas cantidades de ácido cianhídrico (0'0001 N) se explica perfectamente porque actúa sobre el metal directamente produciendo cianuros tóxicos o insolubles separando a aquél del sistema.

Pero deben consignarse, como hechos inexplicables con esta teoría, el que ni la glucosa ni los ácidos grasos se oxiden por el carbón de sangre aunque son fácilmente oxidables; que si lo es el ácido oxálico en la experiencia *in vitro*, no se oxida nunca en la intimidad de los tejidos y que el CNH tiene siempre una función inactivadora de todo fermento cualquiera que sea su estructura molecular. Añadamos, que el propio WARBURG ha logrado aislar el llamado "Fermento respiratorio amarillo" de la levadura de cerveza y el cual *no tiene* hierro en su molécula; como tampoco lo tienen una serie de cuerpos (Codehidrasas I y II) que también intervienen en los procesos respiratorios de los tejidos.

Teoría de WIELAND.—Tiene su antecedente en el hecho descubierto por TRAUBE en 1882 de que muchas oxidaciones se producen por el simple contacto de la substancia oxidable con oxígeno molecular en medio acuoso y con un metal; éste fija oxidrilos del agua para formar su hidróxido y los hidrógenos sobrantes se unen con el oxígeno para producir agua oxigenada, que es la que en definitiva hace esta oxidación indirecta: $Zn + 2\,H_2O = OH - Zn(OH)_2 + H_2O_2$. WIELAND sacó de aquí la consecuencia (1912) de que en definitiva, el papel del oxígeno molecular no era el de fijarse sobre la substancia oxidable sino el de ser aceptor de hidrógno cedido por ella; es decir, que las oxidaciones son en realidad deshidrogenaciones y no se producen más que en presencia de cuerpos capaces de hacer desprender este hidrógno de la substancia y de retenerlos en su masa siendo, por ello, verdaderos aceptores de hidrógeno. Pueden citarse muchos cuerpos los cuales se oxidan de este modo indirecto: deshidrogenándose; bien directamente o bien con el concurso del agua. El amoníaco y la hidracina se cambian en nitrógeno simple, por deshidrogenación:

$$NH_3 = N + H_3;\ NH_2 - NH_2 = N_2 + 2\,H_2$$

el ácido sufhídrico pasa a azufre, del mismo modo: $SH_2 = S + H_2$; y el ácido sulfuroso se oxida a ácido sulfúrico, ya con la intervención del agua:

$$SO_2 \begin{matrix} H \\ \diagup \\ \diagdown \\ OH \end{matrix} \quad -H = SO_3;\ SO_3 + H_2O = SO_4H_2$$

Entre los cuerpos orgánicos puede citarse la transformación sucesiva de un alcohol en aldehido; y de un aldehido (su hidrato) en ácido:

$$R—CH_2OH \longrightarrow R—COH + H_2$$

$$R—CH\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix} = R—COOH + H_2$$

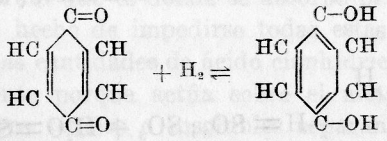
la de un amino-ácido en imino-ácido, el cual se desdobla finalmente en aldehido, anhídrido carbónico y amoníaco:

$$R\text{-}CHNH_2\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}\underset{\underset{NH}{\|}}{C}\text{-}COOH + H_2 \quad ; \quad R\text{-}\underset{\underset{HN}{\|}}{C}\text{-}COOH = R\text{-}COH + CO_2 + NH_3$$

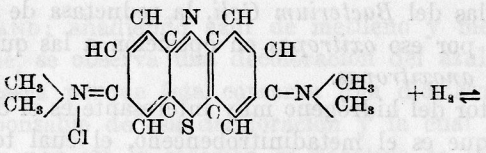
la de una cadena carbonada saturada en su producto de deshidrogenación con formación de doble enlace:

$$R—CH_2—CH_2—R' = R—CH=CH—R' + H_2$$

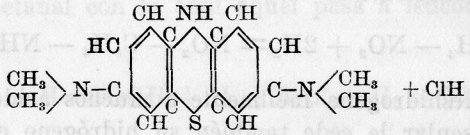
la deshidrogenación de los derivados de la naftalina (pasó de Equilina e Equilenina); y también la transformación del alcohol en ácido acético en la fermentación de las substancias que tienen el primero (vino) mediante las bacterias acéticas. Se requiere, como hemos dicho, siempre, la presencia de un aceptor de hidrógeno; en muchas de las reacciones anteriores este aceptor es el negro de paladio, el cual retiene a aquel gas ocluído o combinándose con él para formar el hidruro correspondiente; pero también se produce la deshidrogenación de la substancia con otros aceptores, tales como la quinona (que pasa a hidroquinona) y el azul de metileno (que pasa a su leucobase incolora):



Quinona. *Hidroquinona.*



Azul de Metileno.



Leucobase.

en presencia de cualquiera de estos dos cuerpos se consigue, incluso oxidar al máximo a la glucosa transformándola totalmente en anhídrido carbónico y agua. A veces sirve de aceptor de hidrógeno el propio oxígeno molecular, el cual se cambia en agua oxigenada:

$$H + O = O = HO—OH$$

in vivo es muy difícil demostrar esta formación porque todos los tejidos tienen catalasa la cual descompone inmediatamente al peróxido de hidrógeno resolviéndolo en agua y oxígeno; pero BERTHO ha podio operar con bacterias lácticas absolutamente exentas de catalasa y demostrar la producción de agua oxigenada cuando aquéllas actúan sobre la glucosa para transformarla en ácido láctico. WARBURG no admite que el oxígeno molecular actúe como aceptor de hidrógeno, sino a lo sumo, como un catalizador intermedio porque interviene la leucoforma del Fermento amarillo descubierto por ese autor (FH) que es la que retiene al oxígeno molecular cediendo su hidrógeno para formar agua; el Fermento amarillo deshidrogenado es luego el verdadero aceptor y actúa como una genuina deshidrasa, muy especialmente en la glucolisis anaerobia. De ahí nació el concepto de respiración sin hierro (el Fermento amarillo no es compuesto ferruginoso) y el de deshidrogenación; esta se lleva a cabo por el dicho fermento o por otras Dehidrasas tales como las de los ácidos láctico (de la levadura) y cítrico (del hígado) o las de la glucosa y sus esteres fosfóricos (del hígado). Sin embargo algunas Dehidrasas actúan con el concurso del oxígeno

molecular (las del *Bacterium Coli,* la reductasa de SCHARDINGER) y se llaman por eso *oxitropas* en oposición a las que no necesitan oxígeno, las *anoxitropas.*

Un aceptor del hidrógeno muy interesante es el descubierto por LIPSCHITZ, que es el metadinitrobenceno, el cual toma hidrógeno para producir metanitrofenilhidroxilamina; como el primer cuerpo es incoloro y su producto de hidrogenación amarillo, la hidrogenación del substrato se observa fácilmente:

$$NO_2 — C_6H_4 — NO_2 + 2H_2 = NO_2 — C_6H_4 — NHOH + H_2O$$

este cuerpo deshidrogena fácilmente a muchos ácidos saturados y el tejido muscular le cede también su hidrógeno en ausencia de oxígeno, respirando así por deshidrogenación; lo mismo le sucede con las bacterias vivas; los espermatozoos, inmovilizados en atmósfera de hidrógeno, recobran su actividad en presencia del metadinitrobenceno; y hasta los narcóticos, que paralizan la respiración en los tejidos, inhiben también la acción de este reactivo. Tan análogo es a las Dehidrasas naturales y tan activo es para las oxidaciones orgánicas, que se ha utilizado en Terapéutica (con los nombres de Nitral, Dinitral, etc.) para combatir la obesidad y hacer desaparecer las grasas de reserva del tejido adiposo, las cuales se oxidan, se queman rápidamente, con el concurso de este cuerpo singular.

A veces el aceptor del hidrógeno es el propio substrato; una parte de él se hidrogena a beneficio de la otra parte que pierde hidrógeno; tal sucede con los aldehidos con intervención de agua:

$$R—C\begin{matrix}O\\H\end{matrix} + R—CH\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix} = R—CH_2OH + R—COOH$$

el caso típico se da con el etanal, el cual se transforma en una mezcla equimolecular de etanol (alcohol) y etanoico (ácido acético); a este proceso químico se llama *Dismutación* o Reacción de CANIZZARO por recuerdo al químico italiano que lo descubrió; y se denominan *Dismutasas* a los Fermentos que le determinan. Ya veremos, al ocuparnos de la glucolisis, la gran importancia y aplicación que tiene este proceso.

La llamada *reacción de la reductasa de* SCHARDINGER, que se utiliza para el diagnóstico diferencial de la leche cruda y de la hervida, se explica fácilmente con esta teoría de deshidrogena-

ción de WIELAND; añadiendo azul de metileno y metanal (formol) a la leche, se observa una decoloración del azul en el caso de la leche fresca porque ésta conserva una diastasa reductora, que es la responsable de esa decoloración y la cual se destruye por el calor, y por eso la reacción es negativa en el caso de la leche hervida. Según la teoría que exponemos, las cosas suceden de otro modo; el azul de metileno es un aceptor de hidrógeno y lo toma del metanal con lo cual aquél pasa a leucobase y éste a ácido fórmico:

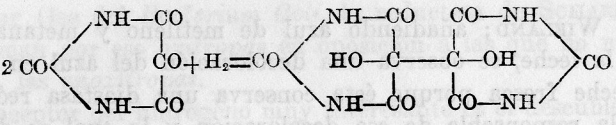
$$H—CH\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix} = H—COOH + H_2 \; ; \; Azul + H_2 = Blanco + ClH \; ;$$

la supuesta reductasa no hace más que activar estas reacciones. Modernamente se ha podido observar que el proceso químico es más complejo, como veremos al ocuparnos especialmente de esta diastasa, pero el fundamento de él es el que acabamos de exponer. La reductasa es una dehidrasa del tipo de la aldehidrasa o aldehidomutasa que provoca una dismutación del aldehido; también se la supone idéntica a la xantinoxidasa.

Esta teoría de WIELAND explica también las supuestas oxidaciones de las largas cadenas carbonadas de los ácidos grasos naturales, los cuales experimentan unas deshidrogenaciones (para originar dobles enlaces en sus moléculas) seguidas de hidrataciones (para producir ácido-alcoholes) y de nuevas deshidrogenaciones (para dar ácidos cetónicos inestables) e hidrataciones (para romper su cadena y originar ácidos con la mitad de carbonos que el primitivo). Por esta serie de procesos químicos y sin la intervención del oxígeno pero sí de las diversas Dehidrasas, puede explicarse la transformación de grasas en carbohidratos y viceversa si la serie es inversa:

R	R	R	R	R
CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
CH_2	CH	CHOH	CO	COOH
CH_2	CH	CH_2	CH_2	CH_3
COOH	COOH	COOH	COOH	COOH

Un aceptor de hidrógeno muy interesante es la aloxana que pasa a aloxantina:



Aloxana Aloxatina

en su empleo está fundada la llamada reacción de STRECKER, en virtud de la cual se pueden desintegrar las moléculas de amino-ácidos transformándose éstos en aldehido, amoníaco y anhídrido carbónico; de este modo se explica el paso de Proteínas (integradas por amino-ácidos) a carbohidratos (formados por condensación de aldehidos) y a grasas (originadas de los hidratos de carbono como acabamos de ver):

$$R—CHNH_2—COOH + H_2O = R—COH + NH_3 + CO_2 + H_2$$

Claro es que también aquí intervienen, al lado de las Dehidrasas, otros Fermentos, tales como las Desaminasas y las Descarboxilasas.

WIELAND reconoce que existen *in vivo* actividades reductoras sin la intervención de Dehidrasas. Tales son las producidas por cuerpos como la cistina y la glutathiona que poseen en su molécula grupos sulfhídrilo SH los cuales pueden perder su hidrógeno (que ceden a los tejidos) oxidándose ellos; o tomar ese hidrógeno la forma oxidada para restablecer los grupos SH primitivos:

$$2\ COOH–CHNH_2–CH_2–SH \rightleftharpoons (COOH–CHNH_2–CH_2–S–)_2 + H_2$$

Cisteína Cistina

$$2\ COOH—CHNH_2—CH_2—CH_2—CONH—CH(CONH—CH_2—COOH)—CH_2—SH$$

Glutathiona reducida $\rightleftharpoons$

$$(COOH—CHNH_2—CH_2—CH_2—CONH—CH(CONH—CH_2—COOH)—CH_2—S—)_2 + H_2$$

Glutathiona oxidada

HOPKINS (1923) logró aislar de la levadura la glutathiona, la cual se encuentra también en todos los tejidos; es un tripéptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina (glicocola) y es, con la cistina, un verdadero transportador de hidrógeno con cuyo con-

curso se explica la respiración intratisular sin intervención de oxígeno, de Fermentos y de metales catalizadores. Como hemos indicado antes, las reacciones son reversibles y están fuertemente influenciadas por el valor de P_H ;en medio ácido ($P_H = 6'8$) la forma reducida G—SH es la estable y su hidrógeno no es cedido; en medio básico ($P_H = 7'4$) sucede lo contrario y la forma anterior pasa a G—S—S—G que es la oxidada, con pérdida de hidrógeno; en medio casi neutro, como sucede en los tejidos, hay reversibilidad de la acción óxido-reductora. Además el sistema Glutathiona-Tejido es termostable y resiste hasta 100°. Actualmente se ha podido demostrar que la acción de la Glutathiona no es expontánea sino que necesita el concurso de un activante, que es el hierro (conforme a la teoría de WARBURG) y que puede ser el cobre, la hemina, o el ácido escórbico (LYMAN y GUZMÁN); y posiblemente también, el de una Dehidrasa; con lo cual ya no debe considerarse a este cuerpo como Fermento respiratorio ni como catalizador intermedio. No puede todavía precisarse la naturaleza química del substrato sobre el cual actúa la Glutathiona; se asegura que lo son (que se hidrogena con él) los ácidos grasos no saturados, y que le ceden su hidrógeno la glucosa y ciertas proteínas; en cambio el hexosamonofosfato, de levadura y de eritrocitos se reduce muy rápidamente con Glutathiona. También este cuerpo funciona como activador de todas las Papainasas, como ya vimos; pero en forma tiol (Con SH libre) porque se combina con indicios del metal allí existente y que es el que paraliza la acción diastásica; en cambio la activación que ejerce sobre la amilasa es debida a la forma oxidada: GS—SG.

También es preciso reconocer la existencia de genuinas Oxidasas además de las Dehidrasas; y así se consignan, y estudiaremos, en la clasificación de OPPENHEIMER.

No son en realidad incompatibles las dos teorías de WARBURG y de WIELAND, que se disputan actualmente la exclusiva para explicar las oxidaciones y reducciones intraorgánicas; en su esencia la primera supone una activación del oxígeno molecular debida a su fijación por el hierro ferroso el cual pasa a férrico; en cambio la segunda supone que el mecanismo de la oxidación consiste en una activación del hidrógeno por las Dehidrasas. La compatibilidad de ambos conceptos reside en la naturaleza del substrato y sobre todo en la fase que se considere. Para la anoxibiosis (desmoli-

sis en ausencia de oxígeno) la teoría de WIELLAND es válida y valiosa; para la fase oxibiótica (final o subsiguiente a la anterior) el concurso del oxígeno es indispensable y entonces su activación por el hierro, según WARBURG, está bien plenamente demostrada. El hidrógeno que se desprende del substrato se une con el oxígeno *activado* (no con el molecular como suponía primitivamente este autor) en la mayor parte de los casos; pero no en todos (las oxidaciones de la hipoxantina, de la xantina y de los polifenoles, requieren, la presencia de oxígeno molecular que acepta hidrógeno activo para formar peróxido de hidrógeno).

No olvidemos nunca que el proceso de oxidación va siempre acompañado de otro inverso de reducción, y recíprocamente. Un cuerpo se oxida a beneficio de otro que se reduce; y es indiferente que consideremos el primer proceso como una fijación de oxígeno en el substrato o como una substracción de hidrógeno. Deberemos siempre por lo tanto, hablar de óxido-reducciones.

Teorías de las cadenas de radicales, de HABER y WILLSTATTER. —No estorba ni contradice esta teoría a ninguna de las anteriores y no tiene al decir de sus autores, más objeto que completarlas. Los Fermentos empiezan por desprender del substrato *un hidrogenion* $H^{\bullet}$ (y no una molécula de hidrógeno como supone WARBURG); este ion hidrógeno va al aceptor y el substrato queda convertido en un radical el cual actúa sobre el resto del substrato en presencia del oxígeno molecular liberándose un radical oxhidrilo que también influye sobre el substrato produciendo un radical. En definitiva, es una activación del substrato por producción en él de radicales sucesivos, los cuales son mucho más reactivos que aquél. Aclararemos con algunos ejemplos esta concepción:

El paso de alcohol a aldehido tiene lugar en virtud de la cadena de radicales que expresan las ecuaciones siguientes:

$$CH_3—CH_2OH + \text{Diastasa} = CH_3—CHOH + H^{\bullet} + \text{Monodesoxidiastasa} \qquad \text{I}$$

$$CH_3—CHOH + CH_3—CH_2OH + O_2 = 2\ CH_3—COH + OH + H_2O \qquad \text{II}$$

$$CH_3—CH_2OH + OH = CH_3—CHOH + H_2O \qquad \text{III}$$

el radical producido en I actúa sobre nueva cantidad de alcohol dando radical OH en II; el OH actúa sobre nueva cantidad de

alcohol y da el radical según III que actúa sobre una nueva cantidad de alcohol, y así sucesivamente.

El aldehido pasa a ácido de modo análogo:

$$CH_3—COH \longrightarrow CH_3—CO+H^{\bullet}$$

$$CH_3—COH+CH_3—CO+O_2+H_2O = 2\ CH_3—COOH+OH$$

$$CH_3—COH+OH = CH_3—CO+H_2O$$

La Dismutación de *Canizzaro* se produce así:

$$CH_3—CO+CH_3—COH+H_2O = CH_3—COOH+CH_3—CHOH$$

$$CH_3—COH+CH_3—CHOH = CH_3—CH_2OH+CH_3—CO$$

La deshidrogenación del ácido succínico para pasar a fumárico en presencia de quinona se expresa del siguiente modo:

$$COOH—CH_2—CH_2—COOH \longrightarrow COOH—CH_2—CH—COOH+H^{\bullet}$$

$$COOH—CH_2—CH—COOH+\text{Quinona} = COOH—CH = CH—COOH+$$

$$\text{Meriquinona } OH—C_6H_4—O—$$

$$COOH—CH_2—CH_2—COOH+OH—C_6H_4—O— = COOH—CH_2—CH—COOH+$$

$$\text{Hidroquinona } OH—C_6H_4—OH$$

En realidad esta teoría ha tenido escasa aceptación aun a pesar de la enorme autoridad de sus autores.

Teoría electrónica. — Ya se inicia en la teoría anterior la consideración del ion hidrógeno con su carga eléctrica positiva. En la teoría que vamos a exponer, las oxidaciones y reducciones se explican por emigración o intercambio de electrones entre el cuerpo oxidante y el oxidado. Decimos que el hierro divalente $Fe^{\cdot\cdot}$ se oxida a trivalente $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ y pasa de ion ferroso a férrico, mediante una oxidación en la cual no figura para nada ni el oxígeno ni el hidrógeno; ha habido simplemente ganancia de un electrón positivo en el átomo de hierro (o pérdida de un electrón negativo); recordemos que en la concepción del átomo según Bohr, el núcleo de estos se encuentra constituído por protones (electrones positivos) idénticos a los del

átomo de hidrógeno rodeados por electrones negativos en mucho mayor número que el de aquellos y de los cuales dependen las propiedades químicas del átomo así como depende de los protones su masa y su peso atómicos. Se admite que el átomo de hidrógeno está formado por un solo electrón y positivo; es el protón aislado, el átomo de electricidad positiva. Existe una correlación estrecha, que casi es identidad, entre valencia, electrón y carga eléctrica.

La oxidación de un ion se caracteriza por la pérdida de electrones negativos o por la ganancia de protones; la reducción tiene las características contrarias; los dos procesos coexisten siempre. La acción de los reactivos oxidantes se explica fácilmente, con esta teoría. Citemos, como ejemplo a dos de los más usados; el permanganato y el cromato potásicos. La acción del primero en medio ácido se explicaba por la reacción siguiente en la cual figura desprendimiento de oxígeno:

$$2\ MnO_4K + 3\ SO_4H_2 = SO_4K_2 + 2\ SO_4Mn + 3\ H_2O + O_5$$

actualmente se explica por la pérdida de cinco electrones positivos del átomo de manganeso (que es heptavalente en el permanganato y es divalente en la sal manganosa que se forma);

$$M : ::: = Mn^{\cdot\cdot} + :::$$

los cinco átomos de oxígeno desprendidos en la primera ecuación corresponden a diez de hidrógeno para las dos moléculas de permanganato que figuran en ella, o sea a cinco átomos de hidrógeno por cada una; (5 protones, 5 cargas eléctricas positivas) que es lo que figura en la segunda ecuación conforme a esta teoría electrónica. Si el permanganato funciona en medio alcalino, es menos oxidante porque pasa a bióxido de manganeso, en el cual el metal funciona como tetravalente; el desprendimiento de oxígeno es menor (O_3 en vez de O_5) y la liberación de electrones también lo es:

$$2\ MnO_4K = 2\ MnO_2 + K_2O + O_3$$

$$Mn : :: = Mn^{::} + ::$$

La acción del bicromato potásico se explica de modo análogo; el cromo hexavalente en esa sal pasa a trivalente en el sulfato crómico liberando tres cargas eléctricas:

$$Cr_2O_7K_2 + 4\ SO_4H_2 = SO_4K_2 + (SO_4)_3\ Cr_2 + 4\ H_2O + O_3$$

$$Cr^{:::} = Cr^{\cdots} + \cdots$$

Las substancias serán más o menos oxidables, y los reactivos más o menos oxidantes, según las facilidades con que las primeras reciban y los segundos cedan esos electrones. Pero en el transporte o emigración de estas masas eléctricas se determinará una diferencia o caída de potencial el cual podrá medirse con relación a una unidad que es el eléctrodo normal de hidrógeno; bien por la presión que allí tienen este elemento y que es de una atmósfera; o bien midiendo la fuerza electromotriz determinada por esa caída de potencial. Pudieran, de este modo, clasificarse los sistemas de Oxidación-Reducción (las dos reacciones se producen casi simultáneamente) o más abreviadamente sistemas Red-Ox, por el valor de su Potencial puesto que cada sistema libera iones H los cuales se descargan en el electrodo hasta que se establezca un equilibrio con éste; ese equilibrio dependerá y se reflejará en la presión del gas hidrógeno. El *Potencial Redox* puede calcularse por la fórmula:

$$E = \frac{0'060}{n} \cdot \log \frac{Ox}{Red} + E_0$$

en la cual *n* es el número de electrones transportados, *Ox* y *Red* son las concentraciones de la substancia oxidada y de la reducida, E_0 es el potencial del eléctrodo de hidrógeno sumergido en una disolución de iones $H^{\bullet}$ y en contacto con una atmósfera de gas hidrógeno. Pero en general, el potencial Redox se expresa por el símbolo R_H que es igual al logaritmo del número inverso de la presión de hidrógeno necesaria para osstener el equilibrio del eléctrodo normal de hidrógeno; el valor normal de R_H es el de 22 atmósferas:

$$R_H = \log \frac{1}{H} = \log \frac{1}{\text{Presión de H}} = 22 \text{ atmósferas};$$

un tejido o una célula será tanto más oxidable cuanto menor sea el valor de R_H por bajo de la cifra 22; y recíprocamente. El valor de R_H se influye mucho por el de P_H del medio, como es lógico suponer. Para un valor de $P_H = 7$ (casi neutralidad) puede determinarse el de R_H por medio de indicadores determinados; los más usados son los siguientes. los cuales se decoloran o viran a los valores de R_H que se indican en el cuadro:

Azul de metileno	14'14	Thionina	16'06
Azul Nilo	9'2	Orthocresolindofenol	20'50
Fenosafranina	5'70	Metabromofenolindofenol	22'3
Rojo neutro	2'30	Ferricianuro potásico	28'4

El valor de R_H es igual en el núcleo que en el protoplasma de las células; tiene su valor máximo en el cerebro y en el corazón del organismo; su índice medio en los tejidos y su mínimo en el pulmón y en el hígado. En medio anaerobio el valor es de 20 y en medio aerobio baja a 11 ó 12.

Los sistemas oxidoreductores se llaman positivos cuando predomina en ellos la oxidación sobre la reducción; tales son por ejemplo, el Hemoglobina-Oxihemoglobina, el Fermento respiratorio de WARBURG y el citocromo. Los negativos son los genuinamente reductores: Cisteína, o Glutathiona.

Teoría de la β-Oxidación de KNOOP. — La observación fundamental de este investigador es la de la oxidación de los ácidos aromáticos en el interior del organismo cuando su cadena lateral tiene un número *impar* de átomos de carbono; todos son eliminados por la orina al estado de ácido benzoico; si la cadena lateral tiene un número par de eslabones, el ácido eliminado es el fenilacético. Lo explica el autor admitiendo forzosamente que la oxidación de esas cadenas tienen lugar desprendiéndose sus eslabones *dos a dos,* es decir, rompiéndose por el carbono que ocupa siempre la posición β:

$$C_6H_5—CH_2—CH_2—\underset{\beta}{CH_2}+\underset{\alpha}{CH_2}—COOH$$

Acido Fenilvaleriánico.

$$C_6H_5—\underset{\beta}{CH_2}+\underset{\alpha}{CH_2}—COOH$$

Acido Fenilpropiónico.

$$C_6H_5—COOH$$

Acido Benzoico.

$$C_6H_5—CH_2—\underset{\beta}{CH_2}+\underset{\alpha}{CH_2}—COOH$$

Acido Fenilbutírico.

$$C_6H_5—CH_2—COOH$$

Acido Fenilacético.

Ampliando estas observaciones a los ácidos grasos naturales, que todos son acíclicos y de número par de átomos de carbono, se obtendrán sucesivamente los productos de degradación (*siempre de número par de carbonos*). Así, partiendo del ácido esteárico se tendrán sucesivamente los siguientes:

$CH_3—(CH_2)_{13}—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... ácido esteárico
$CH_3—(CH_2)_{11}—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ palmítico
$CH_3—(CH_2)_9—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ mirístico
$CH_3—(CH_2)_7—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ láurico
$CH_3—(CH_2)_5—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ cáprico
$CH_3—(CH_2)_3—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ caprílico
$CH_3—(CH_2)—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ caproico
$CH_3—CH_2—CH_2—COOH$ ..... „ butírico

Todos estos ácidos han podido obtenerse por Dakin empleando como medio oxidante el agua oxigenada con un cristalito de sulfato ferroso. Al llegar al ácido butírico, la oxidación continúa produciendo sucesivamente los cuerpos siguientes:

$CH_3—CH_2—CH_2COOH$ ..... ácido butírico
$CH_3—CHOH—CH_2—COOH$ ..... „ β - oxibutírico
$CH_3—CO—CH_2—COOH$ ..... „ acetilacético
$CH_3—CO—CH_3+CO_2$ ..... „ acetona

Estas experiencias hechas *in vitro* tienen su confirmación en otras practicadas en el interior del organismo. Si éste es diabético hay producción de los tres cuerpos últimos (que se llaman *cuerpos cetónicos*) y que se eliminan por la orina explicándonos su existencia y producción el metabolismo de las grasas. Pero también ocurre lo mismo en el animal normal cuando se le inyecta una gran cantidad de un butirato alcalino. Y lo mismo sucede en el hígado del perro si se le hace pasar en circulación artificial, sangre de buey con ácido butírico; la sangre sale cargada de cuerpos cetónicos. Ahora bien, en la naturaleza no se encuentran más ácidos grasos que los de número *par* de átomos de carbono (todos los anteriormente citados se hallan en la leche) que son, como vemos, los únicos cetógenos. Esto ha hecho pensar a algunos investigadores norteamericanos que la grasa adecuada para la alimentación de un diabético sería la formada

por ácidos de número impar de átomos de carbono; así se ha fabricado sintéticamente una denominada *Intarvin* y que es un glicérido del ácido en C_{17} (heptadecanoico, el mal llamado de antiguo ácido margárico). Pero el resultado no ha sido satisfactorio porque la β-oxidación ciertamente es la predominante pero no la exclusiva; con ella se produce la α-oxidación (degradación eslabón por eslabón) y también la ω y otras.

Citemos todavía la *ω-oxidación,* descubierta y desarrollada por VERKADE; consiste en la oxidación del grupo terminal CH_3 de la cadena del ácido graso, sin desprenderse ningún eslabón de su cadena; entonces el primitivo ácido monobásico se transforma en bibásico y es eliminado como tal por la orina. Se ha podido comprobar este hecho para los ácidos que tienen de 8 a 11 átomos de carbono, especialmente para el caprílico y el cáprico.

$CH_3—(CH_2)_3—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ .....ácido caprílico
$COOH—(CH_2)_3—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$.....ácido octanodióico (subérico)

Se comprende fácilmente que los dos procesos de β y de ω oxidación pueden coexistir y dar origen a toda una serie de diácidos con número par de átomos de carbono hasta llegar al sucínico:

$$COOH—CH_2—CH_2—COOH$$

RESPIRACION CON HIERRO Y SIN HIERRO

Las dos teorías generalmente aceptadas para explicar las Oxido-Reducciones intraorgánicas son la de WARBURG y la de WIELAND; hemos visto que en la primera se admite la existencia indispensable de un metal (el hierro) que actúa como activador o catalizador del fermento o del agente oxidante; en la segunda no se precisa ni siquiera la presencia del oxígeno y el proceso se explica como una deshidrogenación. Evidentemente son conciliables las dos teorías: porque la primera se aplica principal y casi exclusivamente a la fase oxibiótica (aerobia) en la cual interviene siempre el oxígeno como tal substancia; y la segunda tiene su empleo en la fase anoxibiótica (anaerobia) en la cual no se precisa este oxígeno.

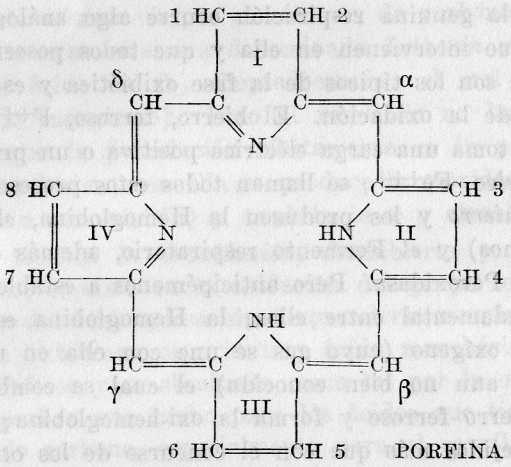
Pero en la genuina respiración ocurre algo análogo. Existen pigmentos que intervienen en ella y que todos poseen hierro en su molécula; son los típicos de la fase oxibiótica y es el metal el responsable de la oxidación. El hierro, ferroso, F^{++}, que todos ellos tienen, toma una carga eléctrica positiva o un proton y pasa a hierro férrico, Fe^{+++}; se llaman todos estos procesos de *Respiración con hierro* y los producen la Hemoglobina, el Citocromo (los citocromos) y el Fermento respiratorio, además de la Catalasa y de la Peroxidasa. Pero anticipémonos a establecer una diferencia fundamental entre ellos; la Hemoglobina es un transportador de oxígeno (cuyo gas se une con ella en unión floja, reversible y aun no bien conocida) el cual se combina con su átomo de hierro ferroso y forma la oxi-hemoglobina; pero no lo cede a los tejidos más que con el concurso de los otros fermentos respiratorios; es transportador pero no donador de oxígeno y realmente no hay en él cambio de valencia de su átomo de hierro el cual es divalente en la Hemoglobina y en la Oxihemoglobina. En los otros fermentos ferruginosos mencionados el hierro ferroso pasa a férrico y viceversa. En todos se necesita oxígeno y el proceso bioquímico es oxibiótico y perfectamente explicable por la teoría de WARBURG.

La respiración sin hierro la llevan a cabo el Fermento amarillo y las Codehidrasas I (Cocimasa de EULER) y II (Coencima de WARBURG); y también coadyuvan el Fermento intermedio, y en muchos casos, diversas otras Dehidrasas (Fumarasa p. e.). Todos estos cuerpos están desprovistos de hierro y ejercen una acción deshidrogenante en fase anoxibiótica y fácilmente interpretada en la teoría de WIELAND.

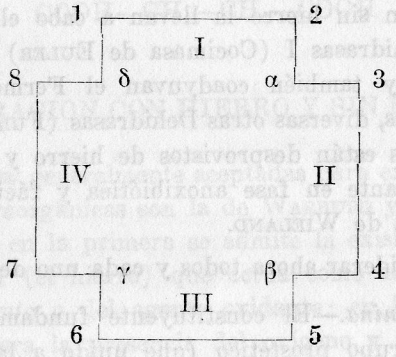
Vamos a considerar ahora todos y cada uno de estos fermentos.

Fermento-Hemina.—El constituyente fundamental de la hemoglobina, su grupo prostético (que unido a la globina constituye aquel fundamental pigmento respiratorio) es el llamado *Proto-Hem,* que es una Protoferroporfirina.

Todo el considerable grupo de las Porfirinas, naturales y sintéticas, está formado por cuerpos que derivan de uno fundamental denominado *Porfina* por KIRMANN:

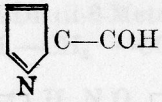


Se representa más cómodamente por el esquema simplificado siguiente, en el cual se numeran con romanos los cuatro pirroles integrantes, con números latinos los eslabones de los vértices de ellos disponibles para la substitución y con las primeras letras griegas, los eslabones CH de enlace entre los núcleos pirrólicos:

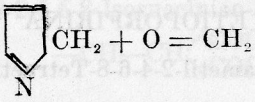


Llamamos la atención del lector respecto a las fórmulas de la *Porfina* y de *todos sus derivados*: la posición de los dobles enlaces en los pirroles y en los metinos, puede variar, porque no está todavía definitivamente establecida (Pirrol I con un solo = en 1—2, o con dos = en 1—2 y en N—δ, etc.)

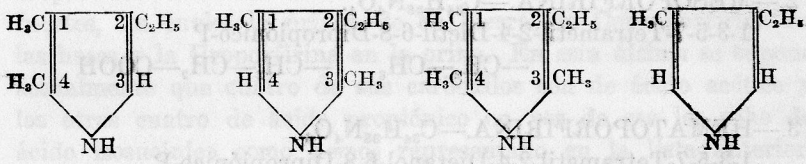
Este cuerpo ha logrado obtenerse recientemente por síntesis; HANS FISCHER, que ha sido el creador de toda la Química de las Porfirinas, ha conseguido Porfina artificial autocondensando Pirrol-α-aldehido:



ROTHEMUND ha logrado la síntesis de este mismo cuerpo condensando pirrol con formol:

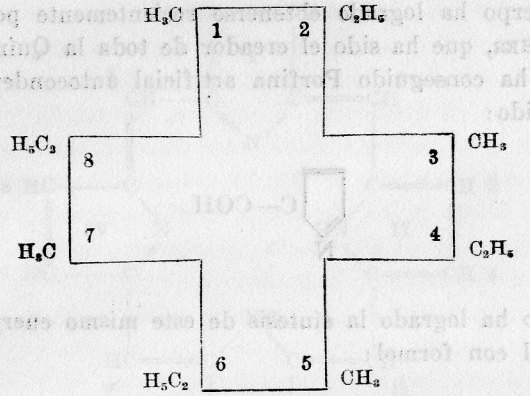


Substituyendo átomos de hidrógeno por radicales diversos, en los núcleos pirrólicos integrantes de la molécula de la Porfina, se obtienen teóricamente las llamadas *Porfirinas;* muchas de ellas se encuentran repartidas en vegetales y animales; éstas y otras varias artificiales se han obtenido por síntesis; todas son coloreadas y muchas ofrecen fluorescencia purpúrea; se desdoblan en los pirroles componentes que son los siguientes:



PIRROLES

De las Porfirinas la fundamental no oxigenada es la *Etioporfirina* $C_{32}H_{38}N_4$, que resulta de substituir en los pirroles de la Porfina, cuatro hidrógenos por cuatro metilos y otros cuatro por cuatro etilos: es, por tanto, la 1—3—5—7—Tetrametil—2—4—6—8—tetraetilPORFINA:



ETIOPORFIRINA

1-3-5-7-Tetrametil-2-4-6-8-Tetraetil PORFINA.

La substitución de estos radicales por otros en los cuales figuren ya grupos funcionales diversos (doble enlace, alcohol, ácido) nos da otras diversas porfirinas entre las cuales merecen consignarse, como más importantes las siguientes:

1.—PROTOPORFIRINA.—$C_{34}H_{34}N_4O_4$
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Divinil-6-8-Dipropiónico-P
—CH=CH- —CH_2—CH_2—COOH

2.—MESOPORFIRINA.—$C_{34}H_{38}N_4O_4$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dietil-6-8-Dipropiónico-P
—CH_2—CH_3 —CH_2—CH_2—COOH

3.—HEMATOPORFIRINA.—$C_{34}H_{38}N_4O_6$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dietanol-6-8-Dipropiónico-P
CH_3—CHOH— —CH_2—CH_2—COOH

4.—COPROPORFIRINA.—$C_{36}H_{38}N_4O_8$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-6-8-Tetrapropiónico-P
—CH_2—CH_2—COOH

5.—DEUTEROPORFIRINA.—$C_{30}H_{30}N_4O_4$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dipropiónico-P
—CH_2—CH_2—COOH

6.—PIRROPORFIRINA.—$C_{31}H_{34}N_4O_2$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dietil-7-Propiónico-P
$—CH_2—CH_3$ $—CH_2—CH_2—COOH$

7.—RODOPORFIRINA.—$C_{32}H_{34}N_4O_4$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dietil-6-Metanoico-7-Propiónico-P.
$—CH_2—CH_3$ $—COOH$ $—CH_2—CH_2—COOH$

8.—FILOPORFIRINA.—$C_{32}H_{36}N_4O_2$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-Dietil-γ-Metil-7-Propiónico-P
$—CH_2—CH_3$ $—CH_3$ $—CH_2—CH_2—COOH$

9.—UROPORFIRINA.—$C_{40}H_{38}N_4O_{16}$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-6-8-Isosuccínico-P
$—CH—CH\begin{matrix}COOH\\COOH\end{matrix}$

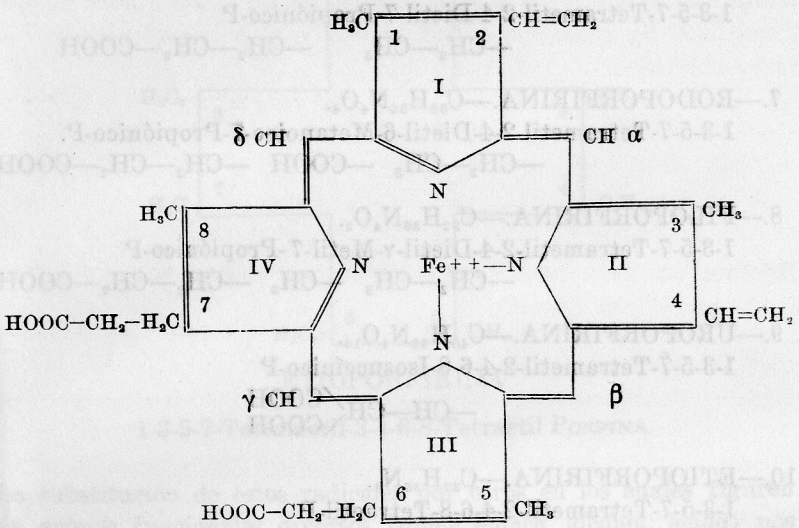
10.—ETIOPORFIRINA.—$C_{32}H_{33}N_4$.
1-3-5-7-Tetrametil-2-4-6-8-Tetraetil-P
$—CH_2—CH_3$

P = PORFINA.

De la lista anterior las Porfirinas números 6, 7 y 8 son constitutivas de las clorofilas, cuyos Pigmentos son de tan parecida estructura química a los Hemáticos (Magnesio en lugar de hierro, etc.) La Mesoporfirina existe en la sangre, la Hematoporfirina se produce al tratar la Hemoglobina o la Hematina con ácidos fuertes, los cuales la privan de su hierro; la Coproporfirina en las heces y la Uroporfirina en la orina. En esta última se supone actualmente que cuatro de sus carboxilos son de ácido acético y los otros cuatro de ácido propiónico en vez de ser los ocho de ácido isosucínico como hemos representado en la lista anterior. Muchas porfirinas se han encontrado también en petróleos, betunes y asfaltos de orígenes animal y vegetal; se distinguen en todas ellas varias series de isomeros que se diferencian por el orden de las cadenas laterales: Tipo I (orden 1-2-3-4-5-6-7-8) y Tipo III (orden 1-2-3-4-6-6-7) por ejemplo.

La Porfirina que más nos interesa ahora es la primera, la *Protoporfirina*; fijándose Fe^{++} en ella, (sustituyendo a los hidrógenos de los grupos NH de los pirroles II y III) se tiene la fórmula de constitución del *Hem* o *Protohem*:

PROTO-HEM



Este cuerpo se ha logrado obtener sintéticamente, como todas las Porfirinas y demás precursores, por los métodos generales de H. FISCHER, establecidos por este investigador y sus colaboradores. Actualmente se discute mucho la forma de unión del hierro con el nitrógeno en todos los compuestos hemáticos y ha sido muy estudiada determinando la susceptibilidad magnética, con lo cual se sabe si el metal está unido iónicamente o por convalencias.

El hierro (como el cobalto y el níquel) tiene número impar de electrones libres en el interior del átomo y no causan susceptibilidad paramagnética porque la entrada de electrones a ese interior, unida con la formación de enlaces de covalencia, hace que algunos o todos de los electrones impares desaparezcan y causen propiedades diamagnéticas (es decir de susceptibilidad negativa) o hagan decrecer la susceptibilidad paramagnética del complejo; esta (S) viene dada por la fórmula:

$$S = \frac{I}{H}$$

siendo *I* la intensidad de imantación inducida y *H* la intensidad de campo magnético; dividiendo el valor de S por la masa específica del cuerpo se tiene la susceptibilidad específica de éste; y multiplicando esta última por el peso atómico o molecular nos da, respectivamente, las susceptibilidades atómicas o moleculares; todas ellas se miden colocando al cuerpo, líquido o en disolución, en un tubo en U, una de cuyas ramas se coloca entre los

polos de un fuerte electroimán en tanto que la otra queda muy alejada de éste; la diferencia de nivel en las dos ramas cuando pasa la corriente permite determinar la susceptibilidad magnética. De este modo han podido establecer PAULIN y CORYELL que en el *Hem* (Protohem, Ferrohem, hematina reducida) el complejo hierro-porfirina no tiene el hierro unido por enlaces de covalencia sino que está en combinación iónica ya que existen cuatro electrones impares demostrables por su conducta magnética; lo mismo le ocurre a la Hemoglobina y tienen ambos una sola banda en su espectro de absorción; en cambio en el Hemocromógeno ferroso, en la Oxihemoglobina y en la Carbohemoglobina (todos cuerpos ferrosos) la unión del hierro con el nitrógeno se hace por covalencias y no es, por tanto, iónica. En los cuerpos férricos: Hematina (Hidróxido de Ferrihem) la unión es siempre iónica.

El *Hem* está unido a una Proteína para formar la *Hemoglobina*; esta unión puede hacerse por una sola valencia del Hem o por dos, pero en el caso de la Hemoglobina siempre es por *una* solamente; esta valencia del Fe se fija en un grupo COOH de la globina; y lo mismo sucede con la Catalasa y con la Peroxidasa. Ninguno de estos tres pigmentos produce Hemocromógeno por reducción a menos que la Proteína se desnaturalice; los tres tienen un lugar de coordinación libre para unirse con oxígeno (Hemoglobina) o con agua oxigenada (Catalasa y Peroxidasa). Los pigmentos que no tienen Fe no se unen a las globulinas; tal sucede con las Porfirinas.

Se ha discutido mucho acerca de la especificidad de las Hemoglobinas porque desde hace tiempo se había observado que su forma cristalina variaba según el animal de que procediese (la de ardilla en cristales exagonales, las otras en rómbicos pero en formas diversas); y también el contenido en agua, la solubilidad y la composición centesimal. Posteriormente se han observado variaciones dentro de la misma especie; los cristales de la Hemoglobina de los negros son monoclínicos en tanto que la de los blancos son rómbicos; los de los recién nacidos también son distintos de los de adultos; el punto isoeléctrico es diferente en la hemoglobina del varón y en la de la hembra; la composición y el espectro de absorción de las hemoglobinas de adultos son bastante diferentes aunque pueden agruparse en unos cuantos tipos. Se ha podido, incluso, probar la existencia de dos hemoglobinas distintas en la sangre del recién nacido; una igual a la de la madre y otra igual a la del feto demostrables por el estudio cinético de la degradación con las bases (Reacción de VON KRÜGER). HAURO-

WITZ ha puesto, además, en evidencia que siempre existen *dos* hemoglobinas en la sangre, una la del adulto y otra la del feto que persiste; en el recién nacido un 15% de la total es de la primera clase y un 75% de la segunda; conforme crece el organismo disminuye la segunda hasta desaparecer.

Actualmente se admite que todas las hemoglobinas, cualquiera que sea su procedencia, tienen exactamente el mismo *Hem*, residiendo sus diferencias en la Globina que las constituye; especialmente en el número, calidad y forma de unión de sus aminoácidos integrantes, lo cual se refleja en la diversidad de sus espectros de absorción. El número total de moléculas de aminoácidos encontrados en la hemoglobina del buey es de $2^6 \times 3^2 = 576$ de los cuales son 3 mol. de cisteína, 12 de arginina, 12 de prolina, 12 de tirosina, 16 de glutamina, 32 de histidina, 32 de ácido aspártico y 36 de lisina (BERGAMANN y NIEMANN); las de otros animales difieren principalmente en el número de moléculas de cisteína (2, 3, 6); la humana de los grupos A y B tiene 14 átomos de azufre y la del grupo O no tienen más que 13. Todas las globinas de vertebrados tienen el mismo tipo de composición, con ligeras variantes: 4% de arginina, 8% de Histidina, y 9% de lisina y en donde se diferencian es en la proporción de cisteína. En cambio la globina de invertebrados difiere de las anteriores en la proporción de los amino-ácidos no sulfurados: 10% de arginina, 3 a 4% de Histidina, y 1 a 2% de Lisina. Por este motivo se distingue a sus Hemoglobinas con el nombre especial de *Eritrocruorinas*, y también *Clorocruorinas* (J. ROCHE). Las Hemoglobinas de vertebrados tienen todas el mismo peso molecular: 68.000; y también lo tienen relativamente bajo todos los pigmentos endocelulares (hemeritrina), en tanto que los del plasma (Hemocianinas, eritrocruorinas y clorocruorinas) son de moléculas enormes, con peso molecular de 300.000 a 500.000; pero siempre en unos y otros con números múltiplos de 17.000. Los cuatro pigmentos respiratorios típicos que pueden agruparse con la Hemoglobina son: Esta, la Clorocruorina, la Hemocianina y la Hemeritrina. Difieren en sus grupos prostéticos: Protohem, Clorocruohem, Hemocuprina y Hemoferrina pero su globina es casi la misma. De las *Clorocruorinas* ya hemos hablado antes; son Hemoglobinas de invertebrados, especialmente de ciertos gusanos marinos (*Polichetos*), de color rojo en soluciones concentradas y

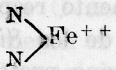
verde en las diluídas; la más reciente de todas las conocidas es la de la lamprea de mar aislada el año pasado por J. ROCHE y M. FONTAINE; está formada por 3,52% de arginina, 7,52% de lisina, 3,37% de histidina y 4,4% de cistina; como los dos primeros amino-ácidos son típicos de la Hemoglobina y los dos últimos, de la Eritrocruorina, resulta este pigmento de la lamprea como intermediario entre los pigmentos respiratorios de los vertebrados y de los invertebrados. La *Hemocianina* es propiamente un Polipéptido cuprífero; la fórmula empírica de la extraída del *Limulus* es: $C_{31}H_{50}O_{15}N_7Cu_2S_2$ el cual se desdobla en un Polipéptido primario que tiene todo el cobre: $C_{17}H_{35}O_{10}N_5Cu_2$ (Hemocuprina) y un compuesto sulfurado, probablemente péptido también: $C_{14}H_{15}O_5N_2S_2$; el grupo no prostético de la hemocianina es un polipéptido formado de tres moléculas de serina, una de leucina y una de tirosina, con algún compuesto sulfurado.—La *Hemocúpreina* de eritrocitos de sangre de buey, aislada por MANN y KEILIN, son cristales que contienen 1,12% de S, 0,34% de Cu y 14,35% de N.

La *Hemeritrina* es un pigmento respiratorio ferruginoso que se encuentra en la Hemolinfa de los *Sipúnculus*; por hidrolisis alcalina o ácida se desdobla en una proteína incolora (sin metal) y un grupo prostético coloreado llamado *Hemoferrina* y que contiene todo el hierro del pigmento. De los cuatro mencionados, dos de ellos (Hemoglobina y Cloro o Eritrocruorina) tienen sus grupos prostéticos de estructura tetrapirrólica y muy parecida; los de los otros dos (Hemocianina y Hemeritrina) no poseen esa arquitectura molecular tetrapirrólica y por ello carecen de espectro de absorción, de fluorescencia y de propiedades peroxidásicas; además en estos dos últimos, su afinidad para con el oxígeno es mayor que la que tienen para el óxido de carbono, y precisamente ocurre todo lo contrario a la Hemoglobina y a la Clorocruorina. También se diferencian por la cantidad de oxígeno que son capaces de retener; en la Hemeritrina es de tres átomos de oxígeno para uno de hierro; en la Hemocianina, de uno de oxígeno para uno de cobre, en la Clorocruorina y en la Hemoglobina también en proporción de uno a uno con el hierro.

Nos limitamos a una simple mención de otros pigmentos respiratorios porque todavía se conoce muy poco de su estructura y comportamiento químicos. Tales son: La *Pinnaglobina*, que existe en la sangre de los Lemalibranquios del género PINNA; es un pig-

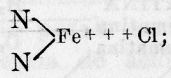
mento pardo, muy parecido a la Hemocianina pero contiene manganeso en vez de cobre; fija bien el oxígeno del aire. La *Helicorubina,* que existe principalmente en el hígado y en los intestinos de los caracoles y de otros moluscos; es un pigmento rojo, muy parecido al Hemocromógeno poseyendo el mismo *Hem* que éste. La *actinichematina,* pigmento rojo de los actinias, muy parecido al anterior y ferruginoso como él. El *Equinocromo,* pigmento respiratorio pardo de los erizos de mar. Y el *Cromógeno vanádico* de los Ascidias, el cual tiene la composición particularísima que expresa su nombre poseyendo vanadio entre sus componentes.

Citemos, todavía, como pigmentos próximos a la Hemoglobina y derivados de ella, los siguientes: La *Protohemina,* que es el *Protohem* (véase antes su fórmula de constitución) cuyo átomo de hierro ha pasado a trivalente (férrico) y ha fijado un OH en su nueva valencia; se la llama también *Oxihemina* y Hematina pura:



ha sido obtenida por H. Fischer precipitando la solución potásica de *Clorohemina* con ácido acético, disolviendo en piridina y cristalizando por adición de éter de petróleo; se encuentra también en las Clorocruorinas; se distinguen varias *Protoheminas* (α, β, γ) resultantes en la acción de los ácidos diluídos sobre la α, que es la que hemos señalado como *Proto-Hem*: la γ *Hemina* de la sangre humana se puede obtener según Schles, digiriendo una solución acuosa de Hemoglobina con pepsina clorhídrica, y agitando luego con éter; se filtra la capa acuosa, se neutraliza y se evapora a vacío; luego se le purifica por método cromatográfico. Una variedad de la α se produce por la acción del alcohol y el iodo sobre el Hem; la β por la del cloro (Ritcher); la α anterior oxidada en ciertas condiciones, se transforma en la *Hemina verde de* Warburg. Las Protoheminas pueden existir libres (sin Globina) en el interior de las células y se han encontrado así en las de levadura. Las Catalasa, Peroxidasa y el Citocromo son también heminas, como veremos más adelante. La *Clorohemina,* llamada también *Protoclorohemina* y antiguamente

Clorhidrato de Hematina, resulta de substituir en la Protohemina tipo su oxhidrilo OH por cloro y tiene el grupo:



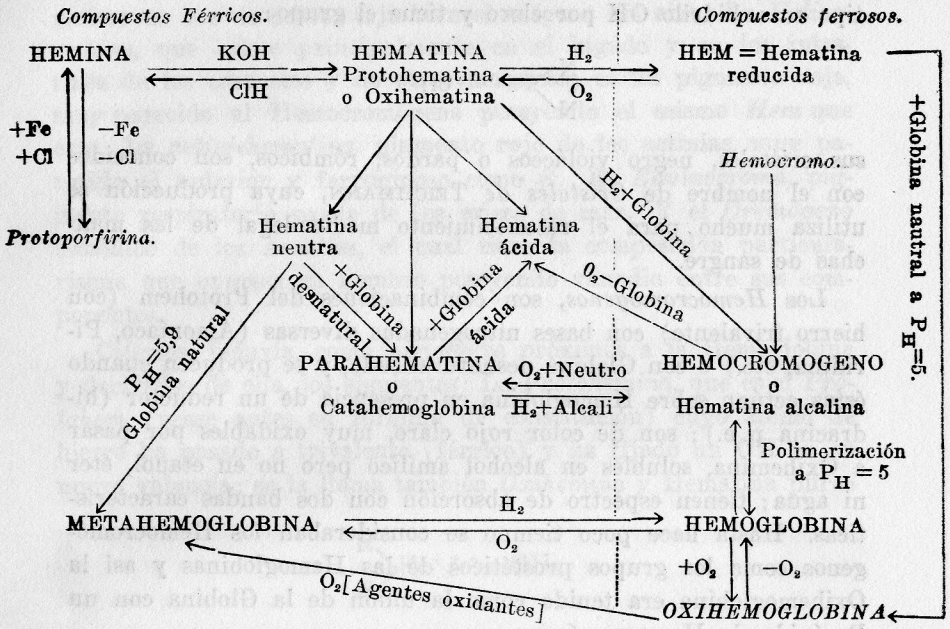
sus cristales, negro violáceos o pardos, rómbicos, son conocidos con el nombre de *Cristales de* TEICHMANN, cuya producción se utiliza mucho para el reconocimiento médico-legal de las manchas de sangre.

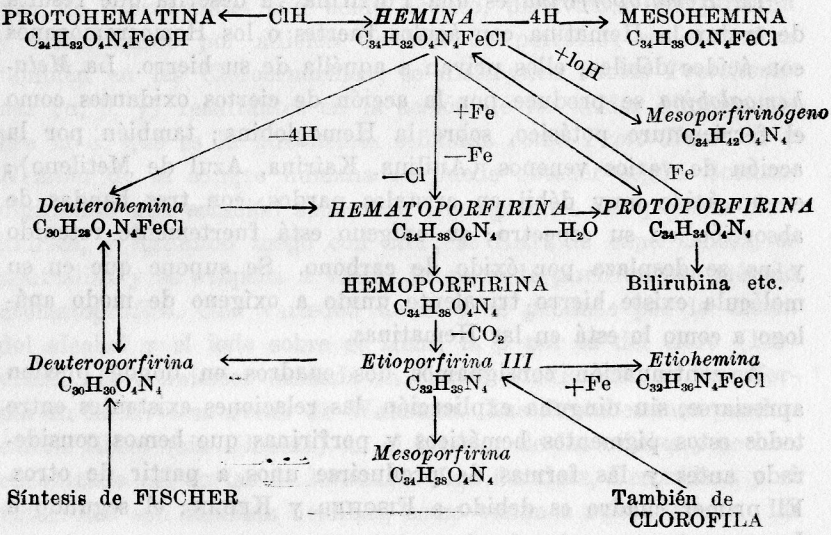
Los *Hemocromógenos,* son combinaciones del Protohem (con hierro trivalente) con bases nitrogenadas diversas (Amoníaco, Piridina, etc.) o con Globina desnaturalizada, y se producen cuando éstas actúan sobre Hemoglobina en presencia de un reductor (hidracina p. e.); son de color rojo claro, muy oxidables por pasar a Oxihemina, solubles en alcohol amílico pero no en etanol, éter ni agua; tienen espectro de absorción con dos bandas características. Hasta hace poco tiempo se consideraban los Hemocromógenos como los grupos prostéticos de las Hemoglobinas y así la Oxihemoglobina era tenida como la unión de la Globina con un Peróxido de Hemocromógeno.

La *Hematoporfirina* es una Porfirina ya descrita que resulta de tratar la Hematina con ácidos fuertes o los Hemocromógenos con ácidos débiles; ellos privan a aquélla de su hierro. La *Metahemoglobina* se produce por la acción de ciertos oxidantes como el ferricianuro potásico, sobre la Hemoglobina; también por la acción de varios venenos (Anilina, Kairina, Azul de Metileno); es un ácido muy débil en cristales pardos, con tres bandas de absorción en su espectro; su oxígeno está fuertemente retenido y no se desplaza por óxido de carbono. Se supone que en su molécula existe hierro trivalente unido a oxígeno de modo análogo a como lo está en las Hematinas.

A continuación consignamos dos cuadros en donde pueden apreciarse, sin ninguna explicación, las relaciones existentes entre todos estos pigmentos hemáticos y porfirinas que hemos considerado antes y las formas de producirse unos a partir de otros. El primer cuadro es debido a FISCHER y KEILIN; el segundo a LEONARD.

ESQUEMA DE FISCHER Y KEILIN





HEMINAS Y PORFIRINAS

Todavía debemos mencionar un nuevo pigmento hemático, de reciente descubrimiento, y que se considera como una *Hemoglobina híbrida.* Se la denomina *Coleglobina* por su descubridor (LEMBERG) y se forma por la acción de agua oxigenada sobre Hemoglobina en presencia de ácido ascórbico; fija oxígeno y óxido de carbono; se diferencia de la Hemoglobina en que su grupo prostético es un pigmento biliar, también descubierto por el mismo autor, la *Verdohematina*; es de color verde y por la acción de los ácidos pasa a Biliverdina, siendo por tanto el intermedio entre pigmentos hemáticos y biliares y no la Hematina ni las Porfirinas, como se creía. Esta *Verdohematina* es idéntica a la *Hemina* verde artificial de WARBURG y NEGELEIN; es capaz de producir un *Verdohemocromógeno,* el cual existe en las preparaciones de *Catalasa,* de *Citocromo* y de eritrocitos. La Verdohematina no tiene estructura tetrapirrólica cíclica sino que deriva del núcleo de la isoverdina en el cual se conservan los cuatro pirroles pero en cadena lineal y no cerrada. LEMBERG supone que la formación de un *Verdo-hem* es el primer paso para la producción de los pigmentos biliares en los animales, por oxidación del *Protohem,* originándose la Biliverdina antes que la Bilirubina. Los derivados verdes de la Hemoglobina han sido también obtenidos por ELDBACHER y sus colaboradores, corroborando los descubrimientos de LEMBERG, pero estiman que su constitución química debe corresponder a la de unos sulfatos hidrobilinrubinférricos.

Finalmente la *Miohemoglobina* es la Hemoglobina muscular que se creyó distinta de la de los Eritrocitos; se la llama también *Miocromo* o *Mioglobina* (MÖRNER) y se consideraba formada por una globina diferente de la de la Hemoglobina, y por el mismo grupo prostético de ésta, o sea el Protohem. Actualmente no se admite diferencia entre la Hemoglobina sanguínea y la muscular, ni en su estructura química ni en sus espectros de absorción. J. ROCHE ha logrado recientemente efectuar la síntesis parcial de Miohemoglobinas uniendo en medio alcalino las Hematinas de sangre o de músculo con las Globinas de ambos orígenes; en definitiva se obtiene siempre la misma Miohemoglobina y luego la misma Hemoglobina. Unicamente puede sostenerse alguna diferencia entre Hemoglobina y Mioglobina, desde el punto de vista biológico; la primera tiene un umbral de eliminación

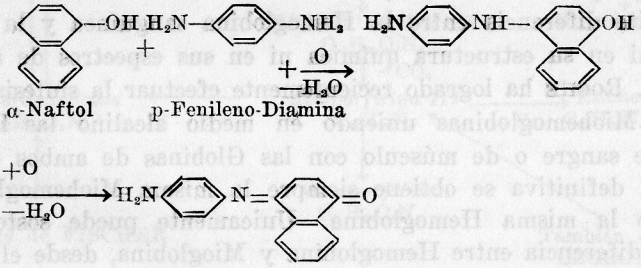
renal que es de 2,3% en la sangre; la segunda pasa al riñón cualquiera que sea la cantidad en la sangre; parece que reacciona mucho más rápidamente con O y CO_2 que la Hemoglobina.

(Para mayores detalles sobre *Pigmentos hemáticos* véase este capítulo en nuestra obra: PIGMENTOS HUMANOS).

* * *

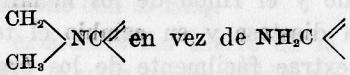
La función respiratoria de todos los pigmentos que hemos considerado se vincula a la que ejercen todas las heminas y los cuerpos similares. Por funcionar como Fermento se la denomina: Fermento-Hemina; el hierro trivalente de su molécula oxida al substrato pasando él a divalente (*Hem*) y este compuesto así reducido toma oxígeno del aire inspirado para volver a Hemina con hierro trivalente. WARBURG designa, como activación del oxígeno por este fermento respiratorio, a la fijación de él sobre el hierro y a su transporte ulterior sobre el substrato. La acción es genuinamente oxibiótica y con intervención del metal; por eso se llama Respiración con hierro. HALDANE llama *Oxigenasa* a este fermento respiratorio.

Indofenoloxidasa.—Para KEILIN, la oxigenasa antes mencionada, o el Fermento-Hemina, no son los determinantes de la oxidación respiratoria sino una oxidasa intracelular bien caracterizada porque produce dentro de las células la oxidación de la mezcla de p-fenilenodiamina y α-naftol para originar azul de indofenol:



AZUL DE INDOFENOL

Substituyendo la p-Fenilenodiamina por su derivado dimetílico:

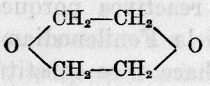


se tiene la conocida reacción de EHRLICH, llamada también *Nadi*-Reacción tomando las sílabas *Na* y *Di* que son las primeras de los nombres de los reactivos. La especificidad de la Indofenolasa está limitada frente a estos reactivos porque actúa muy lentamente con el isomero *Ortho* de la Fenilenodiamina y no lo hace con el *Meta;* como tampoco lo hace si se substituye el α-naftol por cualquier Polifenol. Esta oxidasa se encuentra en todos los tejidos vegetales y animales. Se la ha pretendido identificar con la *Citocromoxidasa* porque ejerce sobre el Citocromo una acción oxidante; y también se la ha considerado idéntica con el Fermento Respiratorio de WARBURG; cuando nos ocupemos de estos cuerpos volveremos sobre esta cuestión. Pero es evidente que la admisión de esta oxidasa va contra la del Fermento-Hemina de WARBURG cuya existencia y función están plenamente demostrados; ni este autor ni KEILIN admiten la identidad del citocromo y el Fermento-Hemina pero el último ha probado el año pasado que la llamada *Citocromoxidasa* es el propio *Citocromo-c* el cual oxida a diaminas, polifenoles, etc., debiendo atribuirse a él muchas de las oxidaciones imputadas a la Indofenoloxidasa. La absoluta identidad de ésta con la Citocromoxidasa ha sido defendida recientemente por STOTZ y sus colaboradores, los cuales prueban que la oxidación de la p-fenilenodiamina (producción de azul de indofenol) es debida a los *citocromos–c* y *b* conjuntamente con su oxidasa especial; para la oxidación de difenoles no se necesita el concurso del Citocromo–b; sin embargo, KEILIN demuestra que la oxidasa del Citocromo es específica y no oxida más que a este cuerpo.

De todos modos la Indofenoloxidasa no es una Hemina pero su evidente parentesco con los Fermentos hemáticos nos ha hecho considerarla aquí.

Catalasa.—Este Fermento, conocido desde hace mucho tiempo, y llamado también *Clastasa,* tiene una especificidad estricta, puesto que no actúa más que sobre un solo y único substrato: el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada: HO-OH. Existe tan repartida en los organismos que puede decirse que no hay célula vege-

tal o animal que no la contenga, salvo las de algunas bacterias anaerobias; el hígado y el riñón de los mamíferos son especialmente ricos en esta diastasa y en cambio el tejido muscular es pobre en ella. Se extrae fácilmente de los órganos que la contienen porque es muy soluble. Se ha podido obtener cristalizada, por SUMNER y DOUNCE, extrayéndola de hígado de buey con dioxano diluído



y precipitando luego el líquido con el mismo disolvente pero concentrado; disolviendo ahora en agua y precipitando con sulfato amónico a saturación, se precipita pura y cristalina. Su espectro de absorción prueba que tiene hierro en su molécula al estado trivalente; los agentes reductores fuertes como el hiposulfito sódico (hidrosulfito) no hacen cambiar la valencia del hierro ni, por tanto, el espectro de absorción; la cantidad que contienen del metal es de 0,1%. Con acetona en medio clorhídrico produce color azul debido probablemente a un producto de desintegración de la hemina. Por cada átomo de hierro cataliza este fermento 100.000 moléculas de H_2O_2.

La acción específica de la Catalasa es ciertamente la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno atómico. Pero HABER y WILLSTAETTER admiten que el primer desdoblamiento del peróxido de hidrógeno es en dos oxhidrilos: $H_2O_2 = HO + OH$; luego cada uno de ellos actúa sobre más peróxido formando radicales HO_2 los cuales pasan a OH y desprenden oxígeno; todos ellos conforme a sus teorías de las cadenas radicales, que ya expusimos, para explicar los procesos de oxidación y de reducción. Su función en realidad es la de descomponer un cuerpo tóxico como el agua oxigenada y el cual se forma cuando el oxígeno molecular actúa como aceptor de hidrógeno en las deshidrogenaciones según WIELAND; si lo que desprende es oxígeno atómico o molecular, es todavía objeto de discusión. La Catalasa es extraordinariamente sensible a la acción del ácido cianhídrico el cual paraliza completamente su actividad; se atribuye este fenómeno a la combinación de dicho ácido con el hierro constitutivo de su molécula, y es reversible porque

recupera la Catalasa dicha actividad si se desaloja el ácido cianhídrico. Lo mismo sucede con el SH_2.

Demostrada la existencia del hierro en la molécula de la Catalasa y explicada su función en los tejidos, se ha pretendido equipararla a la Hemina o a algún derivado de este Pigmento, y se ha supuesto que no se diferenciaba de ella más que en el soporte albuminoideo o Globina teniendo ambas el mismo grupo prostético de *Protohem*. En realidad la Hemina ejerce la misma acción catalítica que la Catalasa sobre el peróxido de hidrógeno pero no se inhibe o detiene por el ácido cianhídrico más que en muy especiales condiciones; esta diferencia de comportamiento se ha hecho más patente comparando los dos Fermentos bien puros; y así Euler y Josephson (1927) han logrado obtener una Catalasa de hígado de caballo, exenta de hemoglobina y de hemina, y de una actividad 10.000 veces mayor que la de esta última. Tratando a la Catalasa con ácido acético e hidracina, se la priva de su hierro y se obtiene una Porfirina con un espectro de absorción muy parecido al de la Protoporfirina hemática. Stern, recuerda que el *Hem* obtenido de Catalasa pura por acción del ácido iodhídrico en medio acético produce una porfirina cuyo espectro de absorción es el mismo de la Mesoporfirina IX lo cual prueba que la Hematina o el Hem de la Catalasa está formado por Protohematina IX y es por tanto idéntico al *Protohem*. Tanto este autor, como Haurowitz y Keilin, insisten en que la Catalasa (como la Peroxidasa y también la Metahemoglobina) tienen el mismo grupo prostético (Hem) y no se diferencian más que en el soporte albuminoideo o Globina; por lo tanto el hierro de la catalasa sería divalente y se uniría primeramente con el substrato para originar un compuesto Hemina-peróxido de hidrógeno el cual ha sido aislado por Haurowitz y es verde, inestable y con hierro divalente. De la misma opinión son Zeile y Hellstrom. Pero Keilin y Lemberg han logrado aislar el producto intermedio Hem-peróxido de hidrógeno con hierro trivalente. En este mismo año Sumner y Dounce han obtenido *Catalasa* pura cristalizada por un nuevo método sin empleo de sulfato amónico y a partir de hígado de buey; han demostrado que está formada por dos moléculas de Hemina. El hecho más importante sobre este interesante Fermento ha sido descubierto hace unos meses por Keilin y Hartree y es el de que la Catalasa es inactiva en ausencia de oxígeno; su forma

oxidada (hierro trivalente) se *reduce* por el peróxido de hidrógeno y la reducida (hierro divalente) se *oxida* por oxígeno, conforme a las siguientes reacciones:

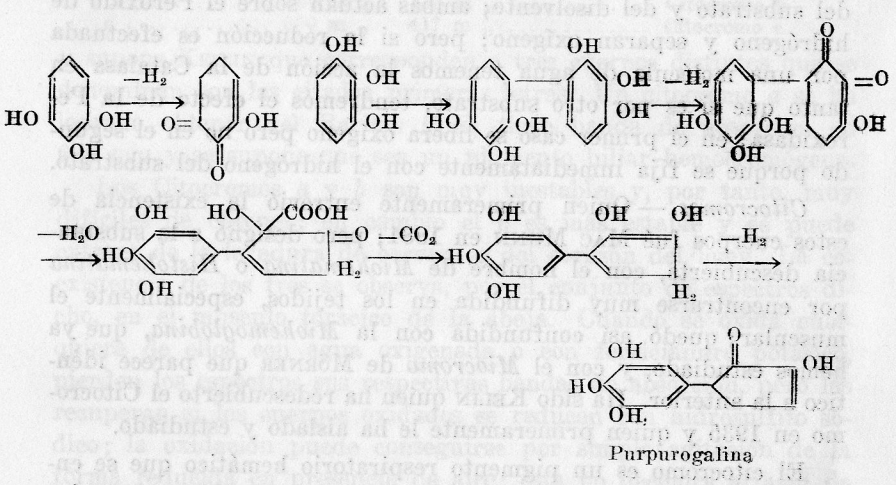
$$4\,Fe^{\cdot\cdot\cdot} + 2\,H_2O_2 = 4\,Fe^{\cdot\cdot} + 4\,H^{\cdot} + 2\,O_2 \text{ y}$$
$$4\,Fe^{\cdot\cdot} + 4\,H^{\cdot} + O_2 = 4\,Fe^{\cdot\cdot\cdot} + 2\,H_2O$$

AGNER en el laboratorio de EULER, ha conseguido dializar a la Catalasa separándola en dos componentes; uno dializable y coloreado (cofermento) y otro indializable, incoloro y albuminoideo (Apofermento); cada uno de ellos libre es inactivo pero el conjunto es muy activo.

Aun cuando no esté totalmente esclarecida la constitución química de la Catalasa, estamos muy próximos a conseguirlo y su evidente parentesco (sino identidad) con el Protohem y con la Hemina está perfectamente establecido.

Peroxidasa.—Se supuso que este fermento actuaba sobre cualquier peróxido liberando parte del oxígeno de éste como atómico o activo. El precedente de su descubrimiento está en el hecho observado por SCHÖNBEIN en 1855 de que la saliva y la mucosidad nasal producían color azul con la tintura de guayaco en presencia del agua oxigenada porque la supuesta peroxidasa de aquellos productos de secreción descomponían al peróxido y liberaban oxígeno el cual lo transportaba a la tintura de guayaco; análogamente se supone la existencia de peroxidasas, completas (con peróxido) o incompletas (sin él) en la teoría de BACH-CHODAT para explicar las óxido-reducciones orgánicas y la cual fué ya expuesta en su lugar correspondiente. La *Peroxidasa* no actúa *in vivo* más que sobre el agua oxigenada porque, aunque, lo puede hacer sobre peróxidos orgánicos: R—O—OH y sobre perácidos, ni los unos ni los otros existen en las células; sobre combinaciones del tipo R—O—O—R′ no actúa este fermento el cual, por otra parte, está muy difundido en vegetales y en animales si bien es difícilmente recognoscible en los primeros por coexistir con varias oxidasas; y en los segundos, por la presencia de Hemoglobina, Citrocromo y otros compuestos hemáticos, los cuales tienen también acción peroxidásica. La reacción más empleada para investigarla es la del pirogalol el cual se transforma en Purpurogalina en presencia de peróxido de hidrógeno; la reacción sirve para la determinación cuantitativa de Peroxidasa; recordemos cómo WILLSTAETTER ha es-

tablecido la Unidad diastásica y el método de valoración fundándose en esta reacción la cual se desarrolla, según él, en las siguientes etapas:



Pero es necesario advertir que esta misma reacción la producen las Mono y Polifenolasas. También se utiliza como reactivo de la Peroxidasa, el guayacol que pasa a Tetraguayacoquinona roja; y la *Nadi*-reacción de EHRLICH, ya reseñada al ocuparnos de la Indofenoloxidasa.

La Peroxidasa se concentra principalmente en las granulaciones de leucocitos linfoides, como ya vimos, y existe abundante también en la leche de vaca pero no en la de mujer. En el reino vegetal el producto más rico en ella es la raíz del rábano rusticano.

La acción de la Peroxidasa se inhibe o detiene por el ácido cianhídrico (WIELAND, 1928), pero muy difícilmente por el óxido de carbono; esto ha hecho pensar en que su hierro se encuentra en su molécula al estado trivalente o férrico; y según KUHN (1931) su espectro de absorción es análogo al de la Hemina. En cambio, KEILIN demuestra que la Peroxidasa se parece mucho a la Metahemoglobina por su comportamiento con los álcalis y con los oxidantes; se une en combinación reversible, con fluoruro y cianuro sódicos, con ácido sulfhídrico y con óxido nítrico; según este investigador, la Peroxidasa es una Proteína-Hematina, es decir, un compuesto de soporte albuminoideo y grupo prostético de Protohematina.

Todavía no está completamente esclarecido si es Hematina (hie-

rro trivalente) o Hem (hierro divalente) el grupo prostético de este fermento el cual positivamente es un compuesto hemático.

La difrencia de acción de la Catalasa y la Peroxidasa depende del substrato y del disolvente; ambas actúan sobre el Peróxido de hidrógeno y separan oxígeno; pero si la reducción es efectuada por una molécula de agua tenemos la acción de la Catalasa en tanto que si es por otro substrato, tendremos el efecto de la Peroxidasa; en el primer caso se libera oxígeno pero no en el segundo porque se fija inmediatamente con el hidrógeno del substrato.

Citocromos. — Quien primeramente entrevió la existencia de estos cuerpos fué Mac Munn en 1884; pero designó a la substancia descubierta, con el nombre de *Miohematina* o *Histohematina* por encontrarse muy difundida en los tejidos, especialmente el muscular; quedó así confundida con la *Miohemoglobina,* que ya hemos estudiado, y con el *Miocromo* de Mörner que parece idéntico a la anterior. Ha sido Kelin quien ha redescubierto el Citocromo en 1935 y quien primeramente le ha aislado y estudiado.

El citocromo es un pigmento respiratorio hemático que se encuentra muy difundido en el reino animal; los Oligoquetos, los Nematodos, los Crustáceos, los Moluscos y, principalmente, los insectos (abejas, arañas, etc.) y los vertebrados (rana, paloma, conejo, cobaya) lo tienen en muy diversos órganos pero sobre todo en el tejido muscular. En cambio no se encuentra Citocromo en las células anaerobias como en las de los Bacilos lácticos; las otras Bacterias, la levadura de cerveza y las plantas de organización superior contienen también Citrocromo. Cuanto más fuerte es la respiración de un tejido, vegetal o animal, tanto más elevada es su proporción en Citocromo.

La importancia extraordinaria que tiene este pigmento reside en ser el primer representante en la escala zoológica filogénica de un fermento respiratorio teniendo en los animales inferiores la misma función que tiene la Hemoglobina en los superiores.

Se presenta en dos formas, oxidada y reducida; la primera no ofrece espectro de absorción característico pero sí la segunda (contrariamente a lo que sucede con la Hemoglobina en la cual la forma oxidada es la que tiene típico espectro de absorción). El espectro del Citocromo reducido está formado por tres bandas en la región del verde (a, b y c) y una cuarta banda (d) en el azul; ésta se desdobla en tres líneas finas cada una de las cuales correspon-

de a cada una de las tres primeras bandas; las posiciones de todas ellas, acopladas, son las siguientes:

a	605 m u +	449 m u	Citocromo a
b	566 m „	433 m „	Citocromo b
c	550 m „	417 m „	Citocromo c

y supone KEILIN que corresponden a tres cuerpos distintos que se denominan con las citadas primeras letras. Un citocromo *a* se ha logrado obtener del Bacilus Coli; tiene banda de absorción en 628 m μ y se supone que sea un pigmento biliar–hemocromógeno.

Los Citocromos *a* y *b* son muy inestables y, por tanto, muy difíciles de obtener; en cambio el *c* es más estable y se puede extraer de la levadura de cerveza o del corazón del buey. La coexistencia de los tres se observa, por el conjunto de espectros dicho, en el músculo torácico de la abeja. Cuando se oxida cualquiera de ellos con agua oxigenada o con ferricianuro potásico, pierden los espectros sus respectivas bandas de absorción, pero las recuperan si los cuerpos oxidados se reducen con hidrosulfito sódico; la oxidación puede conseguirse por simple agitación de la forma reducida en presencia de aire; ésta no decolora al azul de metileno si se conserva en su contacto fuera del oxígeno. La adición de narcóticos indiferentes pasan al Citocromo a su forma oxidada, y la de cianuro potásico, óxido de carbono o ácido sulfhídrico lo retornan a la reducida. El ácido sucínico reduce rápidamente al Citocromo pero en presencia de papilla de músculo; y lo mismo hace la glucosa o el ácido láctico. Esto es debido a que el Citocromo se reduce siempre por las Dehidrasas y se Oxida por las Oxidasas, comportándose como un aceptor de hidrógeno.

El Citocromo *a* es amarillo, el *b* es rojo y el *c* es pardo. Todavía no se ha conseguido aislar el *a*; únicamente KEILIN y sus colaboradores han obtenido el año pasado (1938) unos preparados de músculo de buey muy ricos en esta variedad de Citocromo y poseyendo espectro de absorción con *dos* bandas correspondiendo a dos cuerpos distintos; seguramente el Citocromo *b*, que es muy oxidable y el *a* que no lo es.

El *Citocromo b* ha sido aislado hace dos años por los investigadores japoneses YAKUSHIJI y MORI, de la levadura de pan. Por adición de piridina a este Citocromo se consigue el espectro típico de piridina-protohemocromógeno. Se ha logrado este *Citocromo* b por síntesis uniendo la proteína de levadura con hemocromógeno; y resulta idéntico al natural. Igualmente puede sin-

tetizarse uniendo la Proteína específica del Fermento amarillo con la Protohemina.

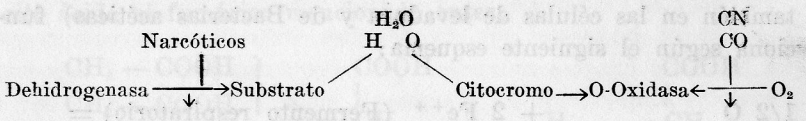
El *Citocromo c* se ha obtenido recientemente en estado de gran pureza. THEORELL parte para ello de 60 kg. de corazón de buey, libres de sangre por centrifugación para conseguir 42 gr. de *Citocromo c*; el método operatorio consiste en tratar esa materia con un peso igual de ácido tricloracético al 2,5%, extraer durante dos horas y centrifugar; neutralizar el extracto con hidrato sódico 6 N/1, separar la porción líquida y añadirle un peso igual de sulfato amónico sólido; filtrar y ajustar el filtrado a $P_H = 4$ con SO_4H_2 5N/1 con lo cual se precipita el *Citocromo c;* se purifica disolviendo en agua y repitiendo la precipitación con sulfato amónico, terminando por adsorberlo con hidrato bárico y eluir el adsorbato con ClH N/10.

KEILIN y ZEILE lo han obtenido también partiendo de la levadura de cerveza. Es adsorbible por caolín en su forma oxidada, pero no en la reducida y tiene un peso molecular igual a 18.700. Muy recientemente (1939) THEORELL ha conseguido por cataforesis obtener este cuerpo en absoluto estado de pureza y totalmente desprovisto del compuesto incoloro que le acompaña siempre; tiene un peso molecular de 13.000 y 0,43% de hierro; ofrece distintas bandas de absorción según el P_H a que se opere y se piensa que existen, por lo menos, cuatro variedades de *Citocromo-c* en su forma oxidada. JUNOWICZ-KOCHOLATY ha encontrado las siguientes cantidades, expresadas en milésimas de milígramo por 100 gramos de tejido. Pecho de pichón 494, corazón de buey 191, brazuelo de cerdo 96, lengua de vaca 88, riñones de ídem 3, carcinoma hepático humano 3. Se discute mucho la estructura química de este *Citocromo-c* y su función biológica. Evidentemente se trata de un cuerpo muy próximo a las Heminas y algunos autores (J. ROCHE) le identifican con la llamada *Hemina* o *Hematina-c;* otros con la *Protohemina* (KEILIN); y otros suponen que es una modificación o variante de las anteriores consistente en la adición de una molécula de agua a un pirrol y de otra al segundo radical vinilo de la cadena lateral de la Protohemina (ZEILE). La resistencia a la oxidación que ofrece el *Citocromo-c* se explica por un cierto impedimento estérico causado por el encajamiento del *Hem* en la molécula de la proteína que le sirve de soporte. THEORELL ha podido probar que su proteína tiene el

mismo punto isoeléctrico que la Globina de la Hemoglobina. El mismo investigador obtiene *Porfirina-c* a partir de *Citrocromo* dializando la solución clorhídrica de éste y precipitando el líquido dializado, por adición de hidrato sódico. Tratando el *Citocromo-c* con ácidos bromhídrico y acético se obtiene hematoporfirina cristalizada cuyo producto de reducción es idéntico a la Mesoporfirina de la sangre.

Finalmente THEORELL opina que el *Citocromo-c* está constituído por una Proteína o Globina unida a un *Hem* (en la forma reducida); la unión se hace a través de azufre de los amino-ácidos de la Globina; esta unión es de tipo tioester, no reversible ni laxa (como pasa en la Hemoglobina, Fermento amarillo, nucleótidos, etc.) sino fuerte y solamente rompible por hidrólisis a 100° con ácido clorhídrico al 20%. El hierro divalente de su forma reducida y el trivalente de la oxidada son los factores determinantes de su aptitud reaccionante en todos los procesos oxibióticos, pues ya vimos que el *Citocromo-c* constituye un sistema (por mejor decir forma parte de un sistema) *Red-Ox*.

Según SHIBATA el Citocromo se une con el oxígeno lo mismo que lo hace la Hemoglobina; el Citocromo oxigenado va a unirse con el sistema Dehidrasa-Substrato para formar un gran complejo (del tipo de los de WERNER) con hierro trivalente del cual se desprende luego el oxígeno regenerando al Citocromo. La acción del Citocromo es la de un Fermento intermedio y no actúa directamente sino formando parte del sistema en el cual hay siempre una Dehidrasa. También se admite en su acción el concurso determinante de una Oxidasa específica denominada Citocromoxidasa y a la cual se ha pretendido identificar con la Indofenoloxidasa que ya estudiamos anteriormente. El sistema completo sería: Substrato (H_2)-Dehidrasa-Citocromo-Oxidasa-O_2 y puede representarse por este esquema:



en el cual se aprecian los dos sistemas conjuntos; el deshidrogenante que da hidrógeno y el oxidante que suministra oxígeno; estos dos elementos se unen luego para formar agua; el sistema primero se detiene por la acción de los narcóticos, en tanto que

el segundo lo hace por el óxido de carbono o por el ácido cianhídrico. Para explicar la acción del sistema deshidrogenante sirve la teoría de WIELAND; para la del oxidante se emplea la de WARBURG; el primero funciona en fase anaerobia y sin hierro; el segundo lo hace en forma oxibiótica y con hierro. Ninguno de los dos sistemas funciona aisladamente; necesita siempre el concurso del otro.

Fermento respiratorio de WARBURG. Este autor ha encontrado en todas las células un Fermento respiratorio muy parecido a la Hemina, de la cual se distingue por una de las bandas de su espectro de la absorción. Se supone que sea una *Feohemina* o Hemina parda, cuerpo intermedio en punto a color entre la Hemina roja de la sangre y la Hemina verde de las hojas vegetales. También tiene grandes analogías con el Citocromo, pero se diferencia de él en su sensibilidad frente al óxido de carbono cuyo gas impide la actividad del Fermento respiratorio en tanto que no actúa sobre el Citocromo. KEILIN admite que es idéntico a la Citocromoxidasa y a la Indofenoloxidasa, cuerpos que ya hemos considerado; admitida esta identidad habría de extenderse a la Oxigenasa de HALDANE, la cual parece también igual al *Fermento-Hemina*. WARBURG supone que este fermento que lleva su nombre está encargado de ceder oxígeno y habla de la activación de este elemento por aquel Fermento en el sentido de ser fijado por el hierro de su molécula para ser luego transportado y cedido al substrato; como su acción se detiene por ácido cianhídrico (que influye sobre hierro trivalente) y por óxido de carbono (que lo hace sobre hierro divalente) se supone que el Fermento respiratorio se une por su Fe^{++} con el oxígeno pasando a Fe^{+++}; éste se reduce por el substrato volviendo a Fe^{++} en tanto que el substrato se oxida.

Según HAAS (1934) el sistema Fermento respiratorio-Citocromo, (que existe en el hígado y en la retina principalmente pero también en las células de levadura y de Bacterias acéticas) funciona según el siguiente esquema:

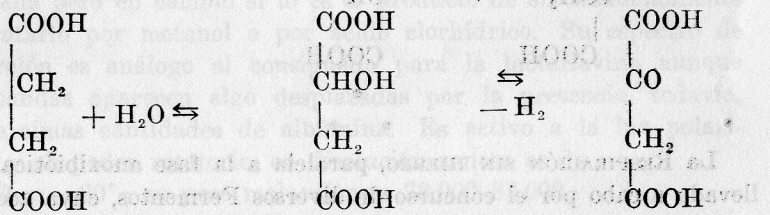
$$1/2\ O + 2\ Fe^{++}\ \text{(Fermento respiratorio)} =$$
$$2\ Fe^{+++}\ \text{(Fermento respiratorio)} + O --$$
$$2\ Fe^{+++}\ \text{(Fermento respiratorio)} + 2\ Fe^{++}\ \text{(Citocromo-1)} =$$
$$2\ Fe^{++}\ \text{(Fermento respiratorio)} + 2\ Fe^{+++}\ \text{(Citocromo-1)}$$

$$2\ Fe^{+++}\ (\text{Citocromo-1}) + 2\ Fe^{++}\ (\text{Citromo-2}) =$$
$$2\ Fe^{++}\ (\text{Citocromo-1}) + 2\ Fe^{+++}\ (\text{Citocromo-2})$$
$$2\ Fe^{+++}\ (\text{Citocromo-2}) + 2\ Fe^{++}\ (\text{Citocromo-}\alpha) =$$
$$2\ Fe^{++}\ (\text{Citocromo-2}) + 2\ Fe^{+++}\ (\text{Citocromo-}\alpha)$$
$$2\ Fe^{+++}\ (\text{Citocromo-}\alpha) + \text{Substrato} - H_2 =$$
$$2\ Fe^{++}\ (\text{Citocromo-}\alpha) + H_2{}^{++}$$
$$H_2{}^{++} + O^{--} = H_2O$$

con lo cual se constituyen dos sistemas Redox de los cuales el del Fermento respiratorio es de mayor potencial que el del Citocromo.

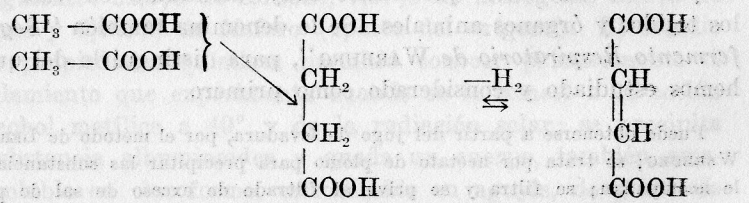
Sin embargo SHIBATA no admite en la actuación del citocromo ningún cambio de valencia de su átomo de hierro y, por lo tanto, ningún transporte de electrón que es lo que genera la diferencia de potencial.

El sistema fumárico de SZENT-GYÖRGY.—Este gran investigador húngaro ha demostrado que en la respiración de los tejidos interviene fundamentalmente una dehidrasa específica, llamada *Malicodehidrasa,* de acción reversible, y que transforma el ácido málico en oxalacético; dicho ácido málico proviene del fumárico por la acción de una hidrasa (*Fumarasa*).



ácido fumárico — ácido málico — ácido oxalacético

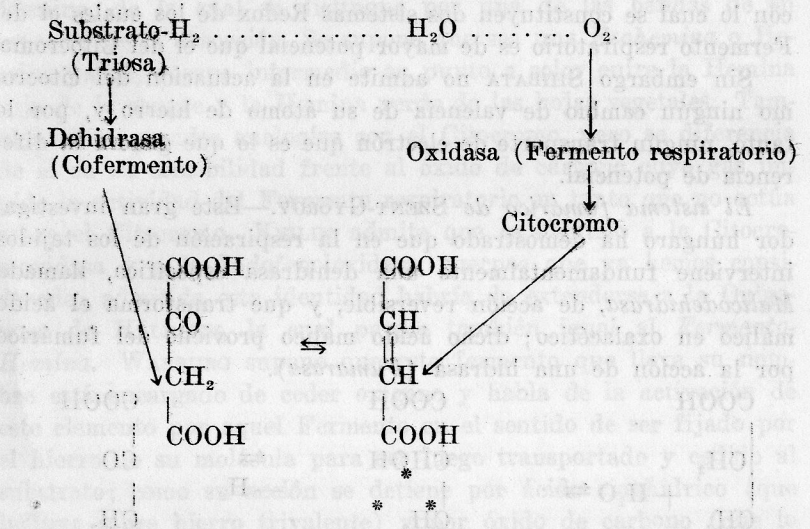
la presencia de estos cuerpos está bien demostrada en los tejidos; el ácido acético se cambia en sucínico durante los procesos de fermentación que describiremos más adelante; la sucindehidrasa pasa este ácido al fumárico mencionado antes:



La serie completa de productos en la fermentación de la glucosa (Glocolisis) será (Fases anaerobia y oxidativa):

Glucosa-Alcohol-Aldehido-Acido acético-Acido sucínico-Acido fumárico-Acido málico-Acido oxalacético.

(Este último puede descarboxilarse y pasar a pirúvico: COOH —CO—CH_3). El ácido oxalacético influye decisivamente como hidrogenante y también impide el acceso del oxígeno a los tejidos. Actúa conjuntamente con el citocromo, de la forma que se consigna en el esquema siguiente:



La Respiración sin hierro, paralela a la fase anoxibiótica, es llevada a cabo por el concurso de diversos Fermentos, cuya acción no se detiene por la de diversos venenos (ácido cianhídrico, óxido de carbono) precisamente por la falta de metal en su molécula. Consideremos los más importantes.

Fermento amarillo de Warburg.—Fué descubierto en levadura de cerveza y dado a conocer en 1932 por Warburg y Chiristian; después se ha visto que existe muy difundido en casi todos los tejidos y órganos animales. Se le denomina también *"Segundo fermento Respiratorio de* Warburg", para distinguirlo del que ya hemos estudiado y considerado como primero.

Puede obtenerse a partir del jugo de levadura, por el método de Lebedew-Warburg; se trata por acetato de plomo para precipitar las substancias que le acompañan; se filtra y se priva al filtrado de exceso de sal de plomo,

añadiéndole una mezcla de fosfatos mono y disódicos; se filtra nuevamente y se le agrega acetona al nuevo filtrado, agitando; se separa la capa cetónica y se le hace pasar a su través una corriente de anhídrido carbónico, manteniendo el líquido a 0°, con lo cual se precipita el fermento amarillo impuro al estado líquido oleoso. Se consigue una primera purificación disolviéndole en agua, dializando la disolución con tabique de celofana, precipitando lo no dializado con acetona, recogiendo este precipitado, disolviéndolo en agua y sacudiendo la disolución con cloroformo a 37°, con lo cual se precipitan restos de albuminoides; y evaporando el líquido clorofórmico. Una purificación mucho más acabada ha sido lograda por THEORELL sometiendo a la cataforesis en aparato especial la disolución clorofórmica al 20% del pigmento ya purificado, con un $P_H = 4{,}2 - 4{,}5$, y con una corriente de 220 voltios y 5 miliamperios; el fermento amarillo se recoge en el cátodo, libre de proteínas que van al ánodo y de polisacáridos que no se transportan por la corriente eléctrica; recogiendo el producto depositado, disolviéndole en agua, precipitando la disolución a un $P_H = 5{,}2$ con otra saturada de sulfato amónico y dializando, se consigue el cuerpo cristalizado, el cual se conserva bien y sin alteración en la oscuridad y en sitio seco.—Remitimos al lector, para los detalles prolijos de esta técnica, a la bibliografía consignada al final de este capítulo.

Se presenta en cristales microscópicos que parecen pertenecer al sistema cúbico, y de color amarillo intenso, muy soluble en agua y bastante en cloroformo. No es dializable a través de la celofana pero en cambio sí lo es el producto de su desdoblamiento al tratarlo por metanol o por ácido clorhídrico. Su espectro de absorción es análogo al consignado para la lactoflavina aunque las bandas aparecen algo desplazadas por la presencia, todavía, de mínimas cantidades de albúmina. Es activo a la luz polarizada y su poder rotatorio, en disolución acuosa es de $[\alpha]\ D = -30°$; su peso molecular es 73.000–83.000.

Los agentes reductores le decoloran y transforman en una "Leucoforma" pero agitando ésta con aire (o con azul de metileno) recobra su color primitivo; en esta fácil reducción y oxidación se funda su interesante acción biológica.

La composición elemental, deducida de su análisis, corresponde a la siguiente: 51,5% de carbono, 7,37% de hidrógeno, 15,9% de nitrógeno y 0,043% de fósforo (aparte del oxígeno). El estudio de sus propiedades químicas permitió conocer primeramente el desdoblamiento que experimenta cuando se le somete a la acción del alcohol metílico a 40° y de la radiación solar; se precipita una substancia albuminoidea y queda un cuerpo, también amarillo, soluble en cloroformo, cristalizable en agujas, de punto de

fusión 330°; de composición $C_{13}H_{12}N_4O_2$ y completamente idéntico con la lumilactoflavina. El ácido clorhídrico ejerce una separación análoga, en albúmina y otro pigmento amarillo (lumilactoflavina) separables por diálisis pero susceptibles de unirse, reversiblemente, para reconstruir el fermento amarillo. La parte albuminoidea de su molécula tiene un peso molecular próximo a 70.000 y las propiedades de una proteína desnaturalizada por el calor; es susceptible de unirse con hemina, para producir hemocromógeno.

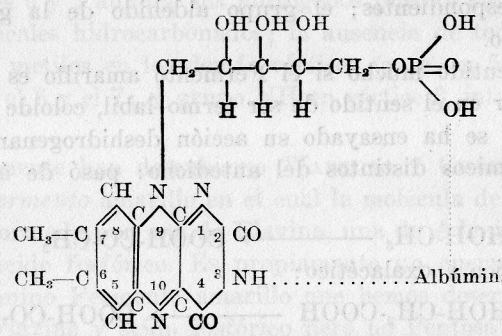
El fermento amarillo no se encuentra unido a polisacáridos ni tiene aptitud para ello como lo demuestra su comportamiento en la cataforesis; pero siempre se encuentran estos carbohidratos junto al fermento no purificado ejerciendo una acción de coloides protectores que dificultan la desdoblante de la acetona o del metanol. La unión con albúmina ya la hemos considerado antes y es indispensable este soporte proteico para que el fermento actúe en los cambios respiratorios de los tejidos, como sucede con todos los fermentos o diastasas conforme a la teoría ya clásica, de WILLSTAETTER. Actualmente se conoce de un modo definitivo la estructura química del *Fermento amarillo de* WARBURG.—Gracias a los trabajos de su principal colaborador, THEORELL, se ha podido averiguar que el complejo que constituye ese fermento es el de un cromo-proteido, desdoblable (como ya hemos visto antes) en proteína y grupo prostético; dicho grupo es un ester fosfórico de la lactoflavina. KUHN ha conseguido sintetizar ese grupo activo prostético de fermento amarillo haciendo actuar el oxicloruro de fósforo disuelto en piridina, sobre la Lactoflavina (obtenida a su vez, por síntesis); el producto sintético conseguido de este modo se comporta exactamente igual que el grupo activo del fermento amarillo natural, cuando se le somete a la cataforesis (va al anodo), a la acción del azul de metileno (igual tiempo de decoloración = 32 segundos), etc. Sin embargo, no puede asegurarse la identidad absoluta porque el producto sintético da sales de bario y cálcio muy solubles en tanto que el natural las produce casi insolubles. THEORELL (1935) ha obtenido cristalizada la sal cálcica del ácido lactoflavinofosfórico; este ácido se une con albúmina, lo mismo el natural que el obtenido sintéticamente por R. KUHN y que los artificiales análogos (el de la l-Araboflavina, etc.) Todos estos compuestos de unión tienen acción fermentativa aunque me-

nos intensa que la del fermento amarillo natural. Este puede considerarse como un Holofermento cuyo Apofermento es la Proteína, siendo el Cofermento el ácido Lactoflavinofosfórico. Esa Proteína que sirve de soporte al Fermento que estudiamos, ha sido estudiada recientemente por KUHN (1937) el cual ha conseguido hidrolizarla con ClH 0,005 N y dializarla luego; se obtiene una mezcla de 8,25% de Arginina, 2,75% de Histidina, 13,7% de Lisina, 7,75% de Tirosina, 5,75% de Fenilalanina, 4,86% de Triptófano, 7,1% de Acido gultámico, y 0,34% de Cistina.

Conocida ya su constitución química se puede apreciar bien la correlación estrecha entre estos dos cuerpos:

Lumilactoflavina (+ Pentosa; Arabinosa Ribosa) = Lactoflavina (Vitamina B_2) (+ Acido fosfórico) = Grupo prostético o Cofermento amarillo (+ Proteína) = Fermento amarillo.

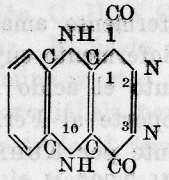
Se discute actualmente la forma de unión del grupo prostético con la Proteína, la cual desde luego es específica. Según KUHN y RUDY (1935) esa unión se hace por el eslabón NH comprendido entre los dos CO de uno de los ciclos de la isoaloxacina; estos autores admiten que la Lumilactoflavina es la 6-7 dimetil-iso-aloxacina. Por consiguiente, la fórmula de constitución del Fermento amarillo sería la siguiente:



FERMENTO AMARILLO

en la cual puede apreciarse la molécula de Lactoflavina así como la de Pentosa (Ribosa), la de ácido ortofosfórico y el soporte albuminoideo.—Algunas lactoflavinas están formadas por moléculas de Arabinosa en vez de Ribosa.

THEORELL supone, además, que la molécula de la base nitrogenada no es isoaloxacina sino Aloxacina normal:



y que la unión con proteína se hace a la vez como queda dicho y además por un grupo OH libre del ácido fosfórico con un NH_2 de la albúmina. El *Fermento* amarillo puede tomar y ceder hidrógeno, estando esta acción vinculada exclusivamente en los eslabones nitrogenados 2 y 10 del esquema de THEORELL o en los 1 y 10 de KUHN; en el primer caso se deshace el doble enlace 2–3 y el hidrógeno de 10 pasa a 3; en el segundo se deshacen los enlaces 1-C y 10-C y los nitrógenos pasan a pentavalentes. De todos modos la acción predominante en el *Fermento Amarillo* es la de una Dehidrasa. Su substrato es principalmente el ester monofosfórico-6 de la Glucosa, llamada *Lactacidógeno* pero puede también actuar sobre los demás esteres fosfóricos de la Glucosa y de la Fructosa (véase más adelante Glucolisis). Sobre ellos actúa con el concurso de las Codehidrasas I y II y el *Fermento intermedio* para transformarlos en esteres fosfóricos de los ácidos glucorónicos correspondientes; el grupo aldehido de la glucosa pasa a grupo ácido.

Se ha dicutido mucho si el Fermento amarillo es un genuino biocatalizador en el sentido de ser termo–labil, coloide y de acción específica; y se ha ensayado su acción deshidrogenante en otros sistemas químicos distintos del antedicho: pasó de ácido láctico a pirúvico:

$$COOH\text{-}CHOH\text{-}CH_3 \longrightarrow COOH\text{-}CO\text{-}CH_3$$

de ácido málico a oxalacético:

$$COOH\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}COOH \longrightarrow COOH\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}COOH$$

y otras análogas. Los estudios de WAGNER-JAUREGG han demostrado que la presencia del Fermento amarillo acelera las reacciones de deshidrogenación, las cuales se producen sin su presencia con una gran lentitud. Es decir, que dicho fermento es un genuino catalizador.

Aparte de esta función, han pensado algunos investigadores, como EULER y sus colaboradores, si el fermento amarillo ejerce una acción bioquímica importante en el proceso de la visión. Efec-

tivamente, se encuentra en la retina del aparato ocular de muchos organismos animales, especialmente en ciertos peces; bien el propio fermento o la Lactoflavina integrante suyo; y viene también en apoyo de este supuesto la extraordinaria sensibilidad que tienen todas las flavinas para la luz. Ya nos ocupamos de este asunto al tratar de la púrpura retiniana al final del capítulo dedicado a Melaninas. Parece más probable la existencia de Vitamina A o de α–carotenos que no la de Fermento amarillo.

En cuanto se refiere al origen y formación de este fermento en los vegetales, y a su transformación y génesis en los animales, nos remitimos a lo dicho de la Lactoflavina a estos respectos. (Véase: J. GIRAL; *Pigmentos del organismo humano*).

Muy modernamente se ha podido demostrar que la acción del Fermento amarillo está vinculada en los núcleos nitrogenados de su molécula (H. RUDY); la pueden ejercer aquellos cuerpos a los cuales les falte el grupo de ácido fosfórico pero conservando el de Pentosa y el de dimetilisoaloxacina juntamente con el soporte proteico; el cuerpo se llama entonces *Flavoproteína*. En el genuino Fermento amarillo, es necesario en cambio que se conserven en su molécula para que no pierda su actividad, los siguientes grupos: El de la Pentosa (Ribosa); los *dos* grupos metilos y precisamente en las posiciones 6 y 7 aunque sus hidrógenos puedan substituirse por algunos radicales hidrocarbonados; la ausencia de toda otra substitución por metilos en los demás vértices (p. e. en 5, 8, 5-7, 6-8) que no sean el 6 y el 7; el grupo NH en vértice 3, intacto, no substituído.

Recientemente han descubierto WARBURG Y CHRISTIAN (1938) un nuevo *Fermento* amarillo en el cual la molécula del grupo prostético está formada por una de Flavina, una de Adenina y dos moléculas de ácido fosfórico. Es propiamente un cuerpo intermedio entre el genuino Fermento amarillo que hemos descrito ya (tiene como éste, Flavina y ácido fosfórico pero no Pentosa) y las *Codehidrasas* (que poseen adenina y ácido fosfórico también pero tienen, además, Pentosa y Amida nicotínica). Existe principalmente en el corazón, el hígado y el músculo de diversos animales, así como en la levadura del pan. Resiste a la acción de los ácidos diluídos en frío, pero se hidroliza en caliente (y en frío con los álcalis) separándose Lumiflavia. Se puede aislar del *Fermento amarillo primitivo* fundándose en que su sal de plata es casi insoluble. Véase

también mas adelante la *Dextroaminacidoxidasa,* pues por este nombre la designan también los autores que la han descubierto.

Con los descubrimientos hechos durante el pasado año y lo que va del actual se ha constituído este nuevo grupo de las llamadas *Flavoproteínas* o *Fermentos amarillos* en el cual se encuentran el primitivo Fermento amarillo ya descrito, la Dextroaminoacidoxidasa y las Flavoproteínas de CORRAN y GREEN, de HAAS, de STRAUB, y una mixta; la de STRAUB se ha identificado con la *Diaforasa* de EULER. He aquí un cuadro comparativo de las principales propiedades de todas estas Flavoproteínas, tomado de DIXON:

Propiedades	1	2	3	4	5	6
Existencia	Levadura	Leche	Levadura	1-3	Corazón	Riñón
Grupo prostético	M	D?	D	D	D	D
Color	Amarillo	Rojo naranja	Amarillo verdoso		Amarillo	
Bandas de absorción	380-465	350-450	377-455	380-465	359-451	
Peso molecular	78.000	280.000				
Id. del grupo de la Flavina	78.000	38.000	60.000			
Grupos de la Flavina por mol.	1	8				
Número máximo de oscilación catalítica	50	550	> 50	35 Ca.	8.500	1.440
Reacción con azul de metileno	+	+	+	+	+	+
Oxígeno	+	+	—	+	—	+
Citocromo *a* y *b*					+	
Citocromo *c*	+	+	+		—	
Codehidrasa I red	+	+			+	—
Codehidrasa II red	+	+?	+	+	—+	—

1 es el primitivo *Fermento amarillo* de WARBURG y CHRISTIAN.
2 es la *Flavoproteína* de CORRAN y GREEN.
3 es la *Flavoproteína* de HAAS.
4 es la *Flavoproteína mixta* formada por la 1 y la 3; WARBURG.
5 es la *Flavoproteína* de STRAUB o *Diaforasa* de EULER.
6 es la *Dextroaminoacidoxidasa* de WARBURG y CHRISTIAN.
M es Lactoflavinofosfato.—D es Flavino-adenin-dinucleótido.

El número máximo de oscilación catalítica (*Turnover number*) es el número de veces que el catalizador es oxidado y reducido por

minuto, pero se le suple por el cociente de dividir el equivalente de hidrógeno del Azul de Metileno reducido en un minuto por el equivalente de hidrógeno de la misma Flavina.

La número *2* ha sido aislada por sus autores de las preparaciones concentradas de Xantinoxidasa de leche de vaca (100 litros de ésta dan 2,5 mg. de Flavoproteina); es de color anaranjado bien distinto de las demás y se reduce por Hiposulfito y reoxida por oxígeno. Parece que su constitución química corresponde a la de un Dinucleótido de flavina y adenina. Activa a la Codehidrasa I como ésta lo hace con el substrato.

La número 3 ha sido aislada por HAAS de la levadura y difiere por su grupo prostético y por su soporte del primitivo Fermento amarillo; los dos factores que la integran han sido aislados y el cuerpo sintetizado mediante su unión. El grupo prostético es también un Dinucleótido de Flavina y Adenina; cataliza la reacción entre Codehidrasa II y azul de metileno, pero no la de la primera con oxígeno; cuando está muy purificada no reduce al Citocromo-c.

La número 4 o mixta resulta por síntesis uniendo el soporte proteico del viejo Fermento amarillo con el grupo prostético de la anterior o *3*. Sus propiedades son muy análogas a las del citado fermento amarillo aún a pesar de tener otro grupo prostético diferente, lo cual demuestra la gran influencia del soporte albuminoideo sobre las propiedades de estos fermentos.

La número 5 ha sido descubierta por STRAUB en diferentes tejidos animales y es idéntica a la llamada *Diaforasa de* EULER y *Factor Coencímico* por GREEN descubiertas unos meses antes, en la levadura de cerveza y en otros tejidos respectivamente. Este mismo año ha encontrado EULER (con ADLER y GUNTHER) otra nueva *Diaforasa* y las distingue con los números I y II porque respectivamente actuan sobre las Codehidrasa I y II transportando hidrógeno de ellas reducidas al Azul de Metileno para decolorarle y explicando cómo estas Dehidrogenasas pueden reaccionar con oxígeno molecular, con Citocromo, o con el citado colorante, siempre a través de las Diaforasas; son estables frente al cianuro potásico. Es de notar que estos cuerpos (con nombres distintos según los descubridores, pero siendo los mismos) actuan sobre el Citocromo pero no con el *c* sino con el *a* y el *b* cuyas funciones no se conocían todavía. EULER prepara la I supendiendo 50 gr. de levadura en 25 c. c. de agua, añadiendo 4 c. c. de amoníaco 4N y tolueno, y autolizando por 48

horas a la temperatura ambiente y a un $P_H = 7,5$ a 8,5; el autolizado se centrifuga y se precipita la Diaforasa I de la solución clara añadiéndole sulfato amónico, centrifugando nuevamente, disolviendo en amoníaco diluído y repitiendo la operación. STRAUB la extrae del músculo cardiaco y encuentra que tiene 0,54% de Lactoflavina y 15,7% de nitrógeno y es muy estable para el calor no destruyéndose por la acción de 60 grados durante 5 minutos; cada molécula puede catalizar la oxidación de 8.500 moléculas de Codehidrasa I. LOCKART la ha separado de algunas plantas superiores. Aparte de lo antes dicho, se ignoran sus otras funciones en la respiración sospechándose que son activas e interesantes. De la número *6* ya hemos hablado y se amplían detalles al tratar de las Aminoacidoxidasas.

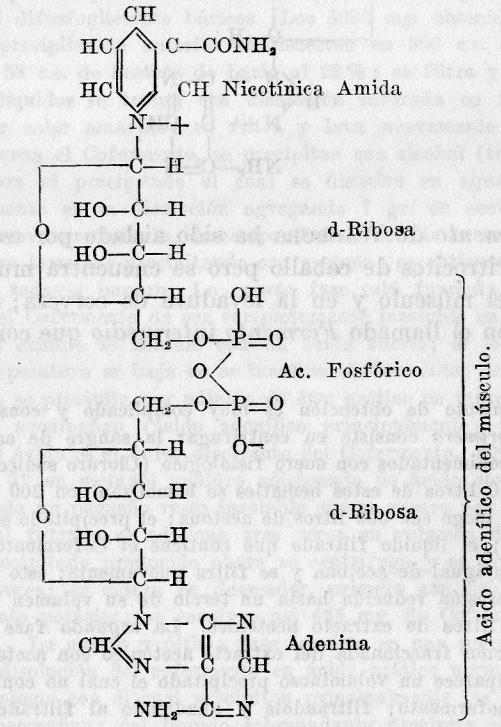
Aun debe añadirse al Grupo una *Fumárico-hidrogenasa* descubierta este año, por F. G. FISCHER y otros, en la levadura, de la cual se separa por precipitaciones repetidas con sulfato amónico y dialisis a 0 grados. Parece que su grupo prostético es también Aloxacina-Adenina-Dinucleótido. Es diastasa hidrogenante de ácido fumárico.

Conocida la composición química de estos cuerpos se comprende que las Fosfatasas puedan hidrolizarles separando ácido fosfórico y que las Nucleoxidasas puedan desdoblar la isoalaxacina de la Pentosa; y que por estos Fermentos o por agentes químicos se haya conseguido la síntesis de su Grupo prostético como se logró la total y completa de las especies químicas que la integran.

Al ocuparnos de las Codehidrasas trataremos de la acción conjunta de éstas con el Fermento amarillo.

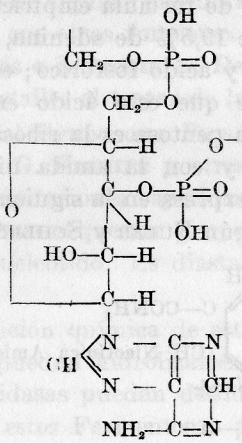
Codehidrasas.—En estos últimos años se han estudiado las funciones químicas de dos Cofermentos muy interesantes y los cuales se denominan *Coencima* de WARBURG y *Cocimasa* de HARDEN-EULER. La más antiguamente conocida era esta última existente en la levadura de cerveza; hace ya muchos años que HARDEN había encontrado que el zumo hervido de esa levadura, dializado y ultrafiltrado, favorecía y aumentaba la fermentación alcohólica cuando se agregaba a los líquidos azucarados fermentescibles; se supuso entonces que ese jugo contenía una diastasa especial protectora de la genuina alcoholasa. Pero han sido principalmente los estudios modernos de EULER y MYRBAECK los que han permitido aislar esta Cocimasa, conocer sus propiedades y determinar su estructura química.

Partiendo de la levadura de cerveza han podido llegar a extraer la especie química en largas agujas sedosas, soluble en agua y precipitable por los ácidos pícrico y picrolónico; fácilmente hidrolizable con ácido sulfúrico N/10 o con ácido clorhídrico y metanol; la simple acción del calor permite separar de ella el ácido fosfórico si se opera en medio alcalino. Hidrogenado con sulfito sódico da un cuerpo que posee banda de absorción en la región ultravioleta del espectro. Las investigaciones hechas por EULER y sus colaboradores han demostrado que la Cocimasa es una especie química de peso molecular = 785 y de fórmula empírica: $C_{21}H_{31}O_{14}N_7P_2$. Por hidrolisis ácida produce 19,5% de adenina, juntamente con amida nicotínica, una pentosa y ácido fosfórico; en estos últimos años se ha probado claramente que este ácido entra en dos moléculas de orthofosfórico, que la pentosa es la ribosa, y que las uniones de estos cuerpos entre sí y con la amida nicotínica y la adenina coresponde a lo que se expresa en la siguiente fórmula de constitución de la Cocimasa (según EULER y SCHLENK, 1937):



CODEHIDRASA I

Es por lo tanto la *Cocimasa* un Difosfopiridinonucleótido y por eso se acostumbra a designarlo con las letras DPN (para diferenciarlo, como veremos, del Cofermento de WARBURG; modernamente se la llama, *Codehidrasa I* por su acción bioquímica. La *Cocimasa* procedente del músculo tiene la constitución antedicha pero la de la levadura posee una de las moléculas de ácido fosfórico engarzada en el carbono–3 de la de Ribosa y, por lo tanto, el final del esquema, representado antes, es ahora el siguiente, (HAUSSER y KINDER):



El *Cofermento* de WARBURG ha sido aislado por este investigador de los eritrocitos de caballo pero se encuentra muy difundido también en el músculo y en la levadura de cerveza; casi siempre está unido con el llamado *Fermento intermedio* que consideraremos después.

El procedimiento de obtención es muy complicado y consta de CINCO FASES. La *primera* consiste en centrifugar la sangre de caballo y lavar los eritrocitos sedimentados con suero fisiológico (Cloruro sódico al 9 por mil) varias veces; 10 litros de estos hematíes se hemolizan con 200 litros de agua y se precipitan luego con 300 litros de acetona; el precipitado se centrifuga y luego se filtra; el líquido filtrado que contiene el Cofermento, se precipita con un volumen igual de acetona y se filtra nuevamente; este nuevo filtrado se evapora a presión reducida hasta un tercio de su volumen con lo cual se consiguen 220 litros de extracto acetónico. La *segunda* fase está fundada en la precipitación fraccionada del extracto acetónico con acetato mercúrico; primeramente aparece un voluminoso precipitado el cual no contiene ni arrastra nada de cofermento; filtrándole y añadiendo al filtrado más acetato

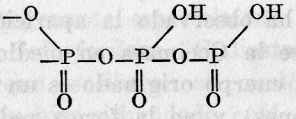
mercúrico se precipita ahora el cofermento. Es necesario hacer un ensayo previo tomando 50 c.c. del extracto cetónico, acidulándolo con 0,1 c.c. de ácido acético 2 N/1 y añadiéndole 1 c.c. de acetato mercúrico al 10%; se precipita, se centrifuga y se filtra; al filtrado se le añade otro c.c. de precipitante y se repite la operación hasta conseguir *cuatro* precipitados los cuales se descomponen con hidrógeno sulfurado, se filtran y lavan hasta llegar a 25 c.c. de líquido; se tienen así *cuatro* líquidos sobre los cuales se ensayan las cantidades de oxígeno que necesitan y se observa que el precipitado primero apenas necesita en tanto que el segundo y el tercero necesitan mucho; con arreglo a ello se procede ahora con la masa principal del extracto cetónico precipitando los 200 litros con 4,4 litros de acetato de mercurio al 10% y 440 c.c. de ácido acético *2N*, filtrando y añadiendo al filtrado (que es en donde se encuentra el Cofermento) 12 litros de la disolución de acetato mercúrico; este nuevo precipitado se recoge y lava, se interpone en agua y se descompone con gas sulfhídrico agitando; se filtra nuevamente y el líquido se concentra y precipita con acetona recogiendo el nuevo precipitado en donde se encuentra casi todo el Cofermento (de las aguas madres puede aprovecharse el resto por nuevas precipitaciones). La *tercera* fase esta fundada en el hecho de ser fácilmente soluble en agua la sal bárica del Cofermento (y precipitable por adición de alcohol) en tanto que son insolubles el fosfato y el difosfoglicerato báricos. Los 5990 mg. obtenidos de las dos fracciones de precipitación anterior se disuelven en 500 c.c. de agua y se precipitan con 53 c.c. de acetato de bario al 22%; se filtra y lava el precipitado, y los líquidos se tratan con disolución saturada en frío de barita hasta conseguir color amarillo; se filtra y lava nuevamente y los nuevos líquidos, que llevan el Cofermento, se precipitan con alcohol (tres volúmenes) recogiendo ahora el precipitado el cual se disuelve en agua, y se precipita el Cofermento en la disolución agregando 7 gr. de acetato mercúrico recogiendo el nuevo precipitado, descomponiéndolo con ácido sulfhídrico, etc., como antes, para terminar precipitando con acetona; se obtienen así 644 mgr. de Cofermento todavía impuro. La *cuarta* fase está fundada en la propiedad que tiene el Cofermento de ser completamente insoluble en metanol, pero se hace soluble cuando se acidula con un ácido fuerte; si éste no es muy fuerte y la temperatura es baja no se inactiva el Fermento; de su disolución alcohólica-ácida se precipita por adición de éter acético en tanto que las substancias que lo acompañan (ácido adenílico principalmente) quedan disueltas; el metanol ácido es el único disolvente del Cofermento. 500 mgr. de éste se disuelven a 0° en metanol anhidro adicionado de ácido clorhídrico N/10 con lo cual queda un pequeño resto insoluble que se separa por centrifugación y filtración; al filtrado se adiciona tres veces su volumen de éter acético glacial y el precipitado producido ahora se centrifuga y se lava con el mismo éter tres veces; se deseca en desecador, primero con ácido sulfúrico y luego con hidrato potásico; se consigue así 465 mg. de Cofermento con una pérdida de 7%. La *quinta* y última fase consiste en una precipitación fraccionada de la disolución del cofermento en ácido acético normal por adición de acetato de plomo con el cual precipitan principalmente las impurezas que todavía le acompañan; del líquido sobrenadante precipita el alcohol, la sal

plúmbica del fermento en parte; y del líquido que queda, por enfriamiento a 0 grados, se deposita la mayor parte de esa sal de plomo. 600 miligramos de cofermento de la fase anterior se disuelven en 200 c.c. de ácido acético N/1 a la temperatura ordinaria; se agregan 32 c.c. de acetato de plomo *N*; se deja una hora entre agua helada, se centrifuga a 0 grados y se obtiene la fracción I de sal de plomo; el líquido separado se calienta a 30 grados y se agrega agitando 60 c.c. de alcohol consiguiéndose el segundo precipitado o fracción II que se separa por centrifugación a 20 grados; el líquido separado se deja 17 horas en la nevera y precipita la fracción III separable por centrifugación a 0 grados; su agua madre se calienta a 30 grados y se le adiciona más alcohol, dejándola en la nevera durante 17 horas; el depósito producido y separado es la fracción IV; las fracciones I y II se juntan, se interponen en agua, se descomponen con gas sulfhídrico, se filtra el sulfuro de plomo y se precipita el líquido con alcohol y ácido nítrico; el precipitado se lava para privarlo de ácido y se deseca; con las otras fracciones se opera lo mismo y se obtiene en total 419 miligramos de Cofermento purísimo con una pérdida de 20%. En total de 100 litros de eritrocitos de caballo se logran 600 miligramos de Cofermento puro; perdiéndose en las manipulaciones otro tanto puesto que la riqueza en Cofermento de un litro de glóbulos rojos es de *12* miligramos.

El Cofermento en su mayor grado de pureza es un polvo amarillo muy soluble en agua y precipitable por el alcohol y la acetona así como por los ácidos fuertes (clorhídrico, sulfúrico y nítrico); los precipitados son coloidales. Es soluble en metanol acidulado, pero insoluble en todos los demás disolvente orgánicos. Es activo a la luz polarizada y su disolución acuosa al 3% presenta un poder rotatorio levogiro de $[\alpha]_D = -24{,}6°$. Su carácter químico es ácido y azulea el papel rojo congo. 1 miligramo de Cofermento disuelto en 0,5 c.c. de agua necesita 0,2 c.c. de solución N/100 de hidrato sódico para neutralizarse frente al anaranjado de metilo y 0,4 c. c. de la misma disolución frente a la fenolptaleína. Procuce algunas de las reacciones coloreadas del triptófano y muchas de las del ácido adenílico de la levadura o del músculo; así p. e. da coloración azul con el α-naftol disuelto en ácido sulfúrico concentrado. Su análisis elemental da la siguiente composición: 34% de C; 4% de H; 13% de N y 12% de Ph. Se puede hidrolizar colocando 50 mgr. de él con 50 c.c. de amoníaco al 2,5% en crisol de porcelana y en autoclave durante 2½ horas a 150 grados; se separa de este modo todo su fósforo al estado de ácido fosfórico. Si la hidrolisis se practica en medio ácido (calentando 50 mgr. del cuerpo con 10 c. c. de ácido sulfúrico N/10 durante 6 horas a reflujo en b. m. hirviendo) no se separa más que un 40% de su

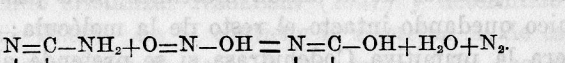
fósforo, pero en cambio se pueden aislar dos bases nitrogenadas; la adenina y la amida nicotínica cuya suma de nitrógenos da exactamente el del Cofermento. La adenina puede separarse por precipitación con sulfato de plata y la amida nicotínica empleando el ácido fosfotungstico y pasando el precipitado, luego a sal de platino. Pueden practicarse determinaciones cuantitativas de esas dos bases, así como también de la pentosa que también contiene su molécula (19,6%), por el furfurol producido al hervirlo con ácido clorhídrico y destilarlo con vapor de agua. El peso molecular determinado por el método crioscópico es de 875 (más elevado que el verdadero por tener lugar alguna asociación molecular).

Modernamente se ha podido establecer que una molécula de *Cofermento* produce por hidrolisis exactamente una molécula de adenina, otra de amida nicotínica, dos de ribosa y tres de ácido orthofosfórico. Su constitución química es, por consiguiente, muy parecida a la que consignamos para la *Cocimasa* de la cual no se diferencia más que en una molécula más de ácido fosfórico; el grupo central de la fórmula de la Cocimasa deberá sustituirse por este otro:



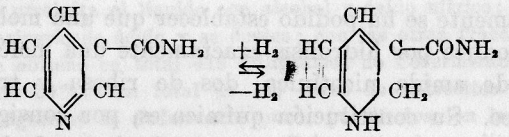
Por tanto, el Cofermento es un Trifosforopiridinonucleótido y por eso se designa con las letras TPN; actualmente se le llama *Codehidrasa II.* Conocida la constitución química de estas dos Codehidrasas se comprende la posibilidad de transformar la una en otra; I pasa a II por fosforación y II pasa a I por desfosforación. EULER ha conseguido llevar a cabo la transformación de la Cocimasa en Coferemnto operando a un $P_H = 7–8$ mediante la acción del ácido fosfórico en presencia de una Fosforilasa.

También han logrado SCHLENK y sus colaboradores desaminar la Cocimasa tratándola con ácido nítrico el cual actúa normalmente sobre el grupo NH_2 de la adenina cambiándole en oxhidrilo y por tanto a ese núcleo en el de hipoxantina:



Como en las respectivas moléculas de las dos Codehidrasas existen grupos oxhidrilos ácidos libres (del ácido fosfórico) y grupos amido o amino básicos libres (de la amida nicotínica y de la adenina) es muy posible que reaccionen entre sí con deshidratación produciendo el láctamo correspondiente según piensa MYRBAECK. Las dos Codehidrasas pueden separarse, como ya vimos, por método cromatográfico empleando Alúmina como adsorbente de la II.

La acción deshidrogenante que ejercen estas dos *Codehidrasas*, y que es reversible, se explica mediante una transposición interna del núcleo pirídico de la amida nicotínica:



Amida Nicotínica. Amida dihidronicotínica.

y de este modo se explica que la forma oxidada sea una base fuerte establece en medio ácido en tanto que a la forma reducida le sucede lo contrario. ADLER ha observado la aparición de un color amarillo cuando se reduce la Cocimasa en medio alcalino con hidrosulfito a $P_H = 13$; el cuerpo originado es un producto intermedio (como las hidroquinonas) y no la forma reducida del Fermento, de la cual se diferencia por su aspecto de absorción y porque reduce a la plata y al azul de metileno. También puede suponerse, para la deshidrogenación reversible de las Codehidrasas, la pérdida o ganancia de electrones libres que tienen los átomos de nitrógeno pirídico y oxígeno fosfórico tal y como se representan en la fórmula de constitución que consignamos para la I anteriormente. Como las fórmulas reducidas tienen fluorescencia y bandas de absorción puede seguirse fácilmente el proceso hidrogenante o el inverso.

Estos procesos hidrogenantes pueden ser reversibles o irreversibles; ejemplo de estos últimos es la acción del hidrógeno gaseoso en presencia del negro de platino; las Codehidrasas fijan H_2 en el núcleo pirídico de la amida nicotínica para pasarlo a ciclo piperidínico quedando intacto el resto de la molécula; pero ya no se regenera la primitiva Codehidrasa si se pretende ahora deshi-

drogenar este cuerpo, como no sea en presencia del Fermento amarillo el cual (por su grupo de aloxacina) es aceptor de hidrógeno y lo toma de la forma reducida de la Codehidrasa. Las hidrogenaciones de éstas con hidrosulfito sódico, son reversibles en cambio; y lo mismo sucede con las efectuadas *in vivo* con los esteres fosfóricos de la glucosa. La actividad de las *Codehidrasas* se mide por lo que se llama *"Capacidad de hidrógeno"* que es la cantidad de este gas que toma la unidad de peso del Cofermento cuando se le coloca en presencia de un exceso de ácido hexosafosfórico; se determina manométricamente tratando la Codehidrasa con Fermento amarillo, que lo deshidrogena por cesión de oxígeno, y midiendo el que ha necesitado para ello: la muestra más pura de Codehidrasa II lograda por WARBURG tiene una capacidad de hidrógeno de 30 c. c. por miligramo de substancia. Queda todavía por dilucidar la función que desempeña la parte de ácido adenílico de estas dos Codehidrasas. SCHELENK y sus colaboradores establecen estas dos hipótesis: 1ª Esta parte de la molécula, especialmente el grupo amínico NH_2 de la adenina, toma parte en la unión del grupo prostético de esas Diastasas con su soporte albuminoideo; 2ª El ácido adenosin-5-fosfórico (durante el funcionamiento de la Codehidrasa como deshidrogenante, especialmente en la glucolisis) puede funcionar como *Cofosforilasa* (Codiastasa transportadora de ácido fosfórico) porque se liberan sus moléculas de ácido fosfórico. No está todavía bien dilucidado cuál de estas dos hipótesis es la verdadera.

La acción de estos Cofermentos sobre los esteres fosfóricos de la glucosa se ha extendido a otros substratos derivados de ellos; así la Codehidrasa I, de la levadura, actúa también sobre los ácidos Dioxiacetona y Gliceraldehidofosfóricos (que derivan respectivamente de la cetona y del aldehido glicéricos); y la extraída del músculo lo hace sobre los ácidos láctico y málico. En cambio la II del hígado actúa sobre la Glucosa sin fosforilar. En todos los casos la acción es deshidrogenante y conduce a la producción de ácidos fosfohexónicos, fosfotriónicos, etc.

Las dos Codehidrasas se distinguen además por el Apofermento o soporte albuminoideo. La I tiene a la llamada *Proteína B*, la cual ha podido cristalizar NEGELEIN (1937) y determinar su peso molecular = 70.000. La II contiene la *Proteína A*, de este autor, la cual es muy diferente de la B aun cuando las dos existen en

la levadura. Esta diferencia en la proteína específica repercute en la acción diferente de las dos Codehidrasas puesto que la II actúa principalmente sobre el ester monofosfórico de la glucosa transformándolo en ester monofosfórico del ácido glucónico en tanto que la I lo hace sobre el ester difosfórico de la Glucosa y también actúa sobre el alcohol para pasarlo a aldehido.

Pero es hora ya de decir que estas Codehidrasas, como su nombre indica, son Cofermentos y no actúan más que en presencia de otras Diastasas. La Codehidrasa II necesita el concurso del Fermento amarillo y, además, del llamado por WARBURG *Fermento intermedio;* el primero actúa como transportador de oxígeno y el segundo como activador del substrato. El mecanismo de acción de los tres Fermentos es el siguiente:

Los dos átomos de hidrógeno del substrato van a la Codehidrasa como ya explicamos antes fijándose en su núcleo pirídico; el Fermento amarillo actúa entonces sobre la forma reducida de la Codehidrasa y toma esos dos átomos de hidrógeno restituyéndola a la forma primitiva; el hidrógeno retenido por el fermento amarillo es cedido después al oxígeno molecular y se produce peróxido de hidrógeno, el cual es descompuesto por el fermento intermedio que retiene hidrógeno y libera oxígeno activo. Necesita además el concurso del magnesio como activador.

La Codehidrasa I necesita también al magnesio como activador; juntamente con fosfatos; el sistema precisa al Fermento amarillo y puede expresarse, según EULER, del modo siguiente:

$$\text{Substrato}—H_2 + \text{Apo}—\text{D}—\text{CoD} \leftrightarrows \text{Substrato} + \text{ApoD}—\text{CoD}—H_2$$

que significa la emigración del hidrógeno del substrato a la Codehidrasa completa (Apodehidrasa o Proteína + Codehidrasa o grupo prostético). La intervención del Fermento amarillo se expresa del siguiente modo:

$$\text{ApoD}—\text{CoD}—H_2 + \text{Fermento amarillo} = \text{ApoD}—\text{CoD} + \text{Fermento amarillo}—H_2$$

Parece demostrado que ni el Citocromo-c ni el oxígeno molecular deshidrogenan a la forma reducida de las Codehidrasas y que únicamente lo hace el Fermento amarillo. Pero es necesario conocer el mecanismo posterior de cesión de ese hidrógeno por este último fermento para lo cual se necesitan aceptores de hidrógeno. Puede serlo el oxígeno molecular como ha probado WARBURG, in-

cluso en las bacterias lácticas anaerobias; no lo es el llamado fermento respiratorio. Según THEORELL (1936) el aceptor es el Citocromo-c y según EULER el oxígeno separado del substrato. Al decir de COOLIDGE interviene la indofenoloxidasa, la cual adsorbe Citocromo y Cocimasa formando un producto catalítico activo. La formación de agua oxigenada en todos estos procesos ha sido muy defendida por BERTHO pero discutida por otros autores.

El *Fermento intermedio,* antes mencionado, ha sido aislado de los eritrocitos de caballo por WARBURG. Es una substancia albuminoidea y, por tanto, de peso molecular muy elevado; se la ha pretendido identificar con la Proteína A, que es el soporte del Cofermento aislada por NEGELEIN. WAGNER-JAUREGG lo ha extraído del músculo de rana y de semilla de calabaza, completamente exento de Fermento amarillo y de Codehidrasa; ha podido observar que su acción deshidrogenante es muy débil pero se aumenta considerablemente si se le añaden los dos últimamente citados. Se une con la Codehidrasa II formando un *Simplexo* que actúa como transportador de hidrógeno. NEGELEIN y HAAS suponen que el fermento intermedio no es realmente una Diastasa porque su soporte proteico no toma parte en las reacciones de deshidrogenación de dicho fermento, como ocurre con sus análogos.

El esquema de *respiración sin hierro* puede, finalmente, representarse del modo siguiente habida cuenta de los hechos y teorías expuestos:

$$\text{Substrato}—H_2 \rightarrow \begin{cases} \text{Apo}—D \ldots \text{Co}—D \\ \Downarrow \\ \text{Apo}—D \ldots \text{Co}—D—H_2 \end{cases} \rightarrow \begin{cases} \text{Fermento amarillo}—H_2 \\ \Downarrow 4 \\ \text{Fermento amarillo} \end{cases}$$

$$\begin{cases} + O = H_2O_2 \\ + Mb = MbH_2 \quad (+ \tfrac{1}{2} O_2 = Mb + H_2O) \\ + Fe\ldots \text{ (Citocromo)} = Fe\ldots \text{ (Citocromo)} \end{cases}$$

Mb representa azul de metileno y Mb-H_2 su leucobase.—Para la acción del Citocromo se necesita la acción de su diastasa específica la Citocromoxidasa.—En el esquema anterior se puede apreciar, también, el paso de Respiración sin hierro a la ferruginosa.

Después de conocer las constituciones químicas y el modo de actuar de todos los Pigmentos respiratorios con y sin hierro, podemos recapitular los tipos o clases distintas de mecanismos de Oxidación y de Reducción, considerando especialmente a los llamados

Transportadores de Hidrógeno y de Oxígeno. De ellos hemos hecho mención en diversas ocasiones pero estimamos pertinente ahora una consideración de conjunto. DIXON establece SEIS tipos distintos de reacción:

El *Primero* y más sencillo puede representarse en su acción por el esquema siguiente:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato} \longrightarrow O_2 \ ;$$

en este caso el substrato reacciona directamente con el oxígeno molecular y la Diastasa no hace más que activar a dicho substrato. Un ejemplo de este tipo es la oxidación de las bases púricas mediante la Dehidrogenasa descubierta por HOPKINS en la leche (véase más adelante la Diastasa de SCHARDINGER) y la cual existe también en muchos tejidos animales. La oxidación de aldehidos, y probablemente de amino-ácidos, corresponde a este tipo.

El *Segundo* está constituído por aquel sistema de Dehidrogenasas que no pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular, pero en cambio pueden reducir y decolorar a diversas materias colorantes, las cuales son las que actúan como *Transportadores* de hidrógeno. La mayor parte de los casos que pueden citarse en este grupo son de sistemas artificiales o Modelos, tan empleados y tan útiles en bioquímica; en ellos el azul de metileno es la materia colorante de preferencia. Pueden representarse gráficamente así:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato} \longrightarrow C \longrightarrow O_2$$

en donde C es el colorante.

En el *Tercero* el cuerpo intermedio o Transportador no es una materia colorante sino una substancia bioquímica, un fermento respiratorio. El sistema es:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato} \longrightarrow C \longrightarrow O_2 \quad (\text{Oxidasa})$$

y la substancia C es casi siempre el citocromo-c, que ya estudiamos, en sus dos formas, oxidada y reducida (con Hierro tri y bivalente, respectivamente). Se diferencia del sistema anterior en que la forma reducida de C no se oxida directamente por O_2 sino que precisa el concurso de otra diastasa que es la *Citrocromoxidasa,*

la cual se ha pretendido identificar con la Indofenoloxidasa y con el Fermento respiratorio o de WARBURG, como ya vimos antes. Este sistema es de gran importancia y a él se refiere todo el proceso de respiración de las células de levadura y de muchas bacterias. Son escasas en número las Dehidrogenasas que activan al substrato en este tipo; las que oxidan al ácido láctico en la levadura (Lacticolisis) y al sucínico en el músculo, son las principales.

En los tipos siguientes intervienen distintos Transportadores, los cuales actúan en *cadena*.—El esquema para el tipo *Cuarto* es el siguiente:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato} \longrightarrow C_1 \longrightarrow C_2 \longrightarrow O_2 \ ;$$

en el cual C_1 puede ser la Codehidrasa II (si el substrato es Hexosamonofosfato) o Codehidrasa I (en otros casos), C_2 es el Fermento amarillo. Debe hacerse notar que cada eslabón de esta cadena es apto para reaccionar solamente con sus contiguos, pero no con ningún otro; el substrato activado no se oxida por oxígeno ni por el Fermento amarillo sino por Codehidrasa; ésta, reducida, no la hace más que por dicho fermento, el cual es el único apto para tomar oxígeno o ceder hidrógeno en presencia de O_2.

En el tipo *Quinto* ya existen tres transportadores:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato} \longrightarrow C_1 \longrightarrow C_2 \longrightarrow C_3 \longrightarrow O_2$$
$$\text{Oxidasa}$$

C_1 es la Codehidrasa, C_2 es el Fermento amarillo, C_3 es el Citocromo-c. Se precisa el concurso de C_2 porque C_1 no es capaz de reducir a C_3 directamente. THEORELL prueba que con la débil presión de oxígeno que tienen los tejidos, la oxidación directa de C_2 es muy lenta pero en cambio este C_2 reducido puede a su vez reducir fácilmente al C_3.

En todos los casos considerados hasta ahora (salvo en los que interviene el Citocromo-c) la molécula de Oxígeno actúa como aceptor de hidrógeno formándose primeramente Peróxido de Hidrógeno. Esto no ocurre en los tipos 3 y 5.

Finalmente el tipo *Sexto* es el sgenuino sistema de SZENT-GYOERGYI que consideramos ya:

$$\text{Dehidrogenasa} \longrightarrow \text{Substrato}_1 \longrightarrow C_1 \longrightarrow \text{Substrato}_2$$
$$\longrightarrow C_2 \longrightarrow O_2$$
$$\text{Oxidasa}$$

el substrato$_1$ es el sucinato el cual pasa a fumarato o substrato$_2$ por C_1 (cuya naturaleza química no se conoce aún pero que no es ni Fermento amarillo ni Citocromo) ; C_2 es el Citocromo-c que pasa el fumarato a término ulterior de oxidación (oxalacético) con el concurso de una oxidasa.

La Respiración celular es la suma total de todos los medios diversos de actuar el Oxígeno y que se acaban de describir; pero es muy difícil discriminar esas formas porque de ordinario se nos ofrecen simultáneamente.

DEHIDRASAS

En este gran subgrupo de las Desmolasas se comprenden todas las Diastasas deshidrogenantes, que activan al hidrógeno separado del substrato. Su acción se aprecia mediante el azul de metileno que actúa como aceptor de ese hidrógeno y se decolora por pasar a su Leucobase:

$$Mb + H_2 = MbH_2$$

Pero es necesario operar en el vacío porque si hay presencia de oxígeno molecular, dicha Leucobase se autoxida y regenera al citado colorante:

$$2\ MbH_2 + O_2 = 2\ Mb + 2H_2O$$

Si el hidrógeno separado del substrato por la Dehidrasa es aceptado por el oxígeno molecular, el Fermento se llama *Dehidrasa Oxitropa;* si lo es por otro aceptor se denomina *Anoxitropa.* Los llamados venenos del hierro (Acido cianhídrico, Acido sulfhídrico y Oxido de carbono) paralizan la acción de las Dehidrasas aerobias pero no las de las anaerobias, las cuales se inactivan, en cambio, por narcóticos; precisamente porque son paralelos, como ya vimos, los procesos Oxibióticos y de Respiración con hierro; y los Anoxibióticos y de Respiración sin hierro.

Las Dehidrasas se llaman también *Dehidrogenasas* e *Hidroquinasas.* — Son muy difíciles de extraer de las células porque se encuentran en el interior de ellas unidas a otros fermentos, constituyendo complejos denominados *Oxidonas* por Batelli y Stern.— Muchas de ellas no actúan más que con el concurso de los Cofermentos ya estudiados (Codehidrasa I y II, Fermento amarillo, etc.) Se distinguen en sus nombres según la naturaleza química del substrato sobre el cual actúan: Aldehidrasas, Alcoholdehidrasas, Aci-

dodehidrasas, Purinodehidrasas y Fenoldehidrasas.—En el siguiente cuadro, de AMMON y DIRSCHERL, se consignan las más importantes, juntamente con los organismos donde se encuentran, su función y sus Cofermentos (D quiere expresar la palabra Dehidrasa); lo completamos con algunos datos de DIXON.

OGSTON describe los métodos de preparación de muchas de ellas y demuestra que en la levadura existen, por lo menos, las siguientes: Láctico, Sucínico, Málico, Cítrico, Glicerofosfórico, Glucosa, Hexosamonofosfato, Hexosadifosfato, Alcohol y Xantinodehidrasas.

CUADRO DE LAS PRINCIPALES DEHIDRASAS

NOMBRE	EISTENCIA	ACCION	COFERMENTO	FERMENTO AMARILLO
Acido-fórmico-D	Bacterias, semillas, Músculo de varios mamíferos	Oxítropa	Codehidrasa I	Sí
Acido-acético-D	Bacterias, Hongos superiores, Tejidos animales — (músculo no)	Oxítropa		
Acido-succínico-D	En casi todos los tejidos vegetales y animales	Oxítropa	No	No
Acido-málico-D	Como el anterior	Oxítropa	Codehidrasa I y II	Sí
Acido-láctico-D	Como el anterior	Anoxítropa	Variable	Variable
Acido-cítrico-D	Falta en plantas superiores	Oxítropa Anoxítropa	Codehidrasa I	Sí
Alcohol-D	Levadura; hígado	Oxítropa	Codehidrasa I	Sí
Aldehidrasa	Leche; hígado	Oxítropa	No	
Diastasa de Schardinger	Leche	Oxítropa		
Acido-glutámico-D	Bacterias, levadura		Codehidrasa II	
Idem	Hígado; plantas		Codehidrasa I	
Acido-hidroxiglutárico-D	Tejidos animales	Oxítropa	No	
Xantino-D	En vertebrados	Oxítropa	No	No
Acido glicerofosfórico-D	Músculo	Oxítropa	Variable	
Triosafosfato-D	Levadura; Músculo	Oxítropa	Codehidrasa I	Sí
Glucosa-D	Hígado	Oxítropa	Codehidrasa I y II	Sí
Ester-Robison-D	Levadura	Oxítropa	Codehidrasa II	Sí
Ester-Neuberg-D	Levadura	Oxítropa	Codehidrasa I	Sí
Ester-Harden-D	Levadura	Oxítropa	Codehidrasa I	Sí
Acido-fosfohexónico-D	Levadura	Oxítropa	Codehidrasa II	

Entre las Alcoholdehidrasas se pueden citar las que existen en el hígado y en el riñón, y las que se encuentran en las bacterias acéticas y determinan la primera fase de la fermentación acética que es el paso de alcohol a aldehido:

$$CH_3—CH_2OH + D = CH_3—COH + D—H_2$$

El aldehido formado pasa a ácido por la acción de la *Acetaldehidrasa*:

$$CH_3—COH + H_2O + D = CH_3—COOH + D—H_2$$

o por Dismutación mediante la *Aldehido-mutasa*:

$$2\ CH_3—COH = CH_3—CH_2OH + CH_3—COOH$$

La *Alcoholdehidrasa* no posee especificidad marcada, puesto que puede actuar también sobre los alcoholes metílico, propílico, isobutílico e isoamílico transformándolos en los aldehidos correspondientes. Muchas veces utiliza como Cofermento la Codehidrasa I y en su actividad oxitrópica intervienen también fermentos ferruginosos como el Citocromo; la supuesta agua oxigenada que pudiera formarse se descompone enseguida por la acción de la Catalasa siempre presente. La acción contraria o reversible, el retorno de aldehido a alcohol lo produce una Diastasa especial hidrogenante llamada *Acetaldehido reductasa* la cual posee un grupo prostético muy similar al de la *Codehidrasa I* y hasta se supone que sea idéntico al de ésta (Warburg y Christian); en realidad la alcoholdehidrasa y la acetaldehidoreductasa son un mismo fermenot de acción reversible cuyo soporte proteico es la Proteína de Negelein.

En las *Aldehidrasas* se comprenden las que actúan sobre aldehidos (mejor sobre sus hidratos) pasándolos a ácidos. Así la Acetaldehidrasa que hemos mencionado antes, y la *Metilglioxaldehidrasa,* de Neuberg, que existe en el músculo y que transforma el hidrato de metilglioxal en ácido láctico pero con el concurso indispensable de la Glutathiona (Lohmann).

$$CH_3—CO—CH\begin{matrix}/OH\\ \backslash OH\end{matrix} \longrightarrow CH_3—CHOH—COOH\ ;$$

no debe confundirse con la *Glioxalasa* del mismo autor porque esta última actúa sobre el mismo substrato (metilglioxal) pero lo cambia en ácido pirúvico

$$(CH_3—CO—COOH).$$

También figura en este grupo la *Glucolasa* del mismo autor y que es la responsable de transformar la molécula de glucosa ya desfosforilada en dos moléculas de metilglioxal:

$$COH—(CHOH)_4—CH_2OH = 2\ CH_3—CO—CH\ (OH)_2$$

Su existencia es negada por MEYERHOFF porque este autor no admite, en la glucolisis, la formación de metilglioxal; ni en la levadura ni en el músculo.

La *Glucosadehidrasa* es también una Aldehidrasa puesto que la Glucosa es un aldehido; actúa sobre el hidrato de este substrato pasándolo a ácido glucónico:

$$COH—(CHOH)_4—CH_2OH \longrightarrow COOH—(CHOH)_4—CH_2OH$$

ha sido descubierta por HARRISON en 1931 y existe en el hígado de diversos animales; necesita el concurso de la Cocimasa o Codehidrasa I o también de la II juntamente con el del Fermento amarillo; se favorece su acción añadiéndole el sistema Citocromo–Citocromoxidasa. Es, naturalmente, distinta de la Hexosa-monofosfatodehidrasa puesto que actúa solamente sobre la Glucosa libre. La Glucosidasa de MULLER (1928) ejerce, en cambio, la misma acción y sobre el mismo substrato; pero es una genuina oxidasa, que precisa la presencia de oxígeno molecular; no existe más que en ciertos mohos.

La α-*Glicerinfosfato-dehidrasa* existe en el músculo (MEYERHOFF, 1919), actúa sobre el ácido glicerofosfórico transformando su grupo alcohólico primario en aldehido y al cuerpo, por lo tanto, en aldehido glicéricofosfato:

$$\begin{array}{l} CH_2—O—PO(OH)_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ -2\ H \\ \leftrightarrows \\ +2\ H \end{array} \quad \begin{array}{l} CH_2—O—PO(OH)_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COH \end{array}$$

su acción es reversible y necesita el concurso de la Codehidrasa I, la cual se hidrogena y cede luego su hidrógeno mediante la intervención del ácido pirúvico existente en el músculo.

La *Hexosadifosfatodehidrasa* existe en el músculo y también en la semilla de pepino; deshidrogena el ester difosfórico de la fructosa (ester de HARDEN-YOUNG) y necesita el concurso del fermento amarillo. La *Hexosamonofosfato-dehidrasa* actúa sobre el ester mo-

nofosfórico de la glucosa (el de ROBINSON) y sobre el de la fructosa (el de NEUBERG); tiene como coadyuvantes a las Codehidrasas I y II y al fermento intermedio según se expresan en el cuadro anterior; se identifica con este último según WARBURG.

El grupo de las *Acidodehidrasas* abarca a todas las que deshidrogenan a diversos ácidos orgánicos.

La *Formicodehidrasa* existe en diversas bacterias y semillas de plantas así como en el tejido muscular de muchos animales mamíferos; tiene como Cofermento a la Codehidrasa I y transforma al ácido fórmico en anhídrido carbónico:

$$H—COOH_2 = CO_2 + H_2 .$$

La *Aceticodehidrasa* existe en hongos, bacterias y ciertos tejidos animales (no en el muscular) pasa el ácido acético a sucínico doblando la molécula:

$$2\ CH_3—COOH = COOH—CH_2—CH_2—COOH + H_2$$

Las *Dehidrasas de ácidos grasos* homólogos de los anteriores existen en diversos tejidos animales; la del propiónico del músculo de buey pasa a este ácido a pirúvico:

$$CH_3—CH_2—COOH \longrightarrow CH_2 = CH—COOH \longrightarrow$$
$$CH_3—CHOH—COOH \longrightarrow CH_3—CO—COOH .$$

En el jugo pancreático, en la bilis y en el hígado existen otras dehidrasas de ácidos grasos (butírico, valeriánico, caproico, etc.) aun no bien conocidas pero que en general pasan el ácido graso a acetilacético, el cual se descompone luego en el riñón (JOWETT).

La *Oxalicodehidrasa* existe solamente en las plantas y se duda si es una genuina oxidasa.

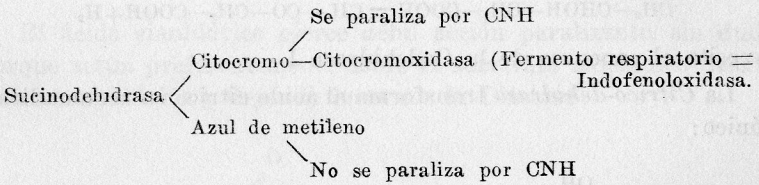
La *Sucinodehidrasa* o sucínico-dehidrasa es una de las más importantes de este grupo. Fué descubierta por THUNBERG (1909) en el músculo de rana como una dehidrasa oxitropa. BATELLI y STERN probaron que se encuentra unida, en el interior de las células, con otras diastasas formando los complejos llamados *"Oxidonas"* por esos autores; el caso se da principalmente con la Indofenoloxidasa para formar la *Sucinoxidona* que, a veces, funciona como si fuera un solo y único fermento. La *Sucinodehidrasa* actúa sobre el ácido sucínico transformándolo en fumárico por deshidrogenación:

$$COOH—CH_2—CH_2—COOH \longrightarrow COOH—CH = CH—COOH + H_2$$

pero generalmente actúa enseguida la Fumarasa que hidrata a este ácido fumárico cambiándolo en málico:

$$COOH—CHOH—CH_2—COOH\ ;$$

únicamente si el músculo se lava bien con agua (antes de tratarlo con disolución de fosfato disódico para extraer la sucindehidrasa) se consigue ésta exenta de Fumarasa. La acción aerobia de la Sucinodehidrasa se inhibe por el ácido cianhídrico pero la anaerobia en cambio llega hasta activarse; la inactivada se reactiva por adición de azul de metileno pero no por el Citocromo, conforme el esquema siguiente de SZENT-GYÖRGYI:



No se precisa la acción coadyuvante de las Codehidrasas ni del Fermento amarillo.

La *Malicodehidrasa* existe también en el músculo de rana, deshidrogena al ácido málico y lo transforma en oxalacético:

$$COOH—CHOH—CH_2—COOH \rightarrow COOH—CO—CH_2—COOH + H_2$$

Pero el ácido oxalacético se descarboxila en seguida (por la presencia y acción de la Carboxilasa) y pasa a ácido pirúvico:

$$COOH—CO—CH_2—COOH = CO_2 + COOH—CO—CH_3$$

la descarboxilación puede continuar sobre el mismo ácido pirúvico el cual se transforma en etanal:

$$COOH—CO—CH_3 = CO_2 + CH_3—COH$$

el cual luego pasa por deshidrogenación de su hidrato a ácido acético. Pero también puede pasar el ácido oxalacético nuevamente a málico actuando como aceptor de hidrógeno, como ha podido demostrarse por ser la acción reversible. Se conoce poco acerca de la especificidad de esta diastasa la cual necesita el concurso del fermento amarillo, de la Codehidrasa I y posiblemente, de la II.

La *Lácticodehidrasa,* encontrada por MEYERHOFF (1919) en el músculo, actúa sobre el ácido láctico pasándolo a pirúvico:

$$CH_3—CHOH—COOH = CH_3—CO—COOH + H_2$$

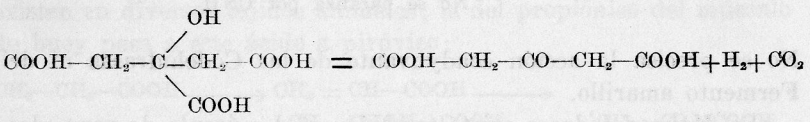
se encuentra también en la levadura y en ciertas bacterias; su especificidad no está aún bien probada aunque se sabe que no actúa más que sobre el ácido láctico natural sarcoláctico, que es el isomore *dextro.* Necesita el concurso de la Cocimasa o Codehidrasa I y del fermento amarillo (para la del músculo de rana pero no para la de la levadura o del *Bacilo Coli*).

La β-*Oxibutirodehidrasa* se encuentra en mohos, bacterias, hígado y músculo; pasa el ácido β-oxibutírico a acetilacético:

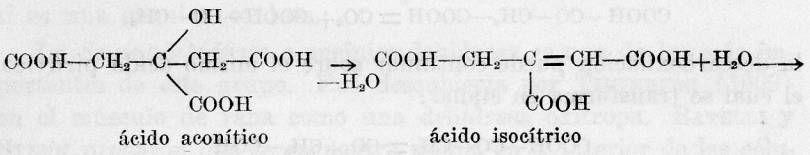
$$CH_3—CHOH—CH_2—COOH = CH_3—CO—CH_2—COOH + H_2$$

necesita el concurso de la Codehidrasa I.

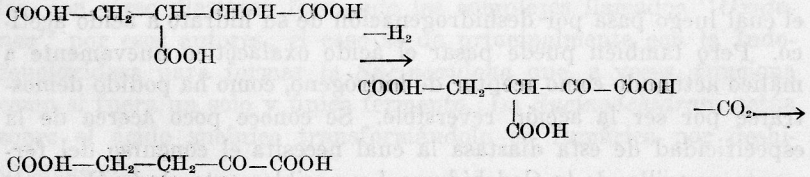
La *Cítrico-dehidrasa* transforma al ácido cítrico en acetonadicarbónico:



con el concurso de la Carboxilasa; necesita Fermento amarillo y Codehidrasa I. Según MARTINS y KNOOP, la diastasa del hígado actúa sobre el ácido cítrico de otro modo y es pasándolo sucesivamente a ácido acónico, ácido isocítrico y, finalmente, a ácido α-cetoglutárico, según expresan las reacciones siguientes:



ácido aconítico — ácido isocítrico



Acido α-Cetoglutárico.

La *Diastasa* de SCHARDINGER ha sido objeto de consideración nuestra cuando nos ocupamos de exponer la teoría de WIELAND para explicar las óxido-reducciones intraorgánicas. Entonces explicamos su acción de Reductasa o Dehidrasa frente al azul de metileno en presencia del aldehido metílico. Conjuntamente con ella actúa una Mutasa o Dismutasa que se encarga de transformar al aldehido en la mezcla de alcohol y ácido correspondientes (Reacción de *Canizzaro*). La genuina Reductasa o Aldehidrasa predomina en su acción sobre la Dismutasa si el aceptor de hidrógeno es el azul de metileno; si el aceptor es el oxígeno molecular, hay la formación de peróxido de hidrógeno:

$$R—CH(OH)_2+O=O = R—COOH+H_2O_2$$

El ácido cianhídrico ejerce débil acción paralizante, sin duda porque actúa preferentemente sobre el substrato aldehídico pasándolo a cianhidrina y dejando intacta a la Diastasa:

$$R—C(=O)—H + HCN = R—CHOH—CN$$

La *Diastasa* de SCHARDINGER (Aldehidrasa-Dismutasa) no tiene especificidad marcada; puede actuar sobre todos los aldehidos ya sean acíclicos, o cíclicos (benzoico, salicílico, etc.). Su método de obtención más moderno es el de SCHWARZ y FISCHER que consiste en lavar la crema de leche varias veces con disolución de cloruro sódico, batirla luego bien y extraerla después por adsorción con alumina y elucción posterior con fosfato amónico; se libera de su materia colorante por la acción de los ácidos diluídos. De modo análogo obtiene BALL la *Xantinoxidasa* cuyas disoluciones—dice—son amarillo pardas y su grupo prostético es amarillo, fluorescente y muy análogo a una Flavina. En la leche existe otra Dehidrasa, que es esta *Xantinoxidasa* que acabamos de mencionar y de la cual nos ocuparemos más adelante. BOOTH ha pretendido demostrar la identidad de ella con la Diastasa de SCHARDINGER. Recientemente (1938) DIXON parece haber probado esa identidad fundándose en que las dos diastasas pertenecen al mismo subgrupo de Dehidrogenasas y tienen la misma especificidad, como aceptoras de hidrógeno, existiendo un gran paralelismo en la cantidad y distribución de

las dos en la leche y en los tejidos; no se ha logrado nunca separar una de otra, pues precipitan, a la vez, por las sales y disolventes orgánicos; se adsorben juntas y se descomponen simultáneamente y por los mismos agentes físicos y químicos; sus actividades se detienen por las mismas variaciones de temperatura, P_H, adición de alcohol, etc.; las dos se inhiben por el ácido úrico y se destruyen por el agua oxigenada; las dos se paralizan por los cianuros y se protegen igualmente contra este veneno, por adición de ácido úrico. En cambio, y según esta autoridad, la *Aldehido-mutasa* es un fermento completamente distinto de los anteriores.

Las *Amino-Dehidrasas*, se las denomina impropiamente *Desaminasas*. Actúan sobre Amino-ácidos diversos transformándolos en ácidos cetónicos y desprendiéndose amoníaco; necesitan el concurso del oxígeno (Oxitropas) y por eso se consideran como genuinas Oxidasas:

$$2\ R{-}CH{-}NH_2{-}COOH + O_2 = 2\ R{-}CO{-}COOH + 2\ NH_3$$

Ni el azul de metileno ni otros aceptores de hidrógeno actúan en su función, pero requieren el concurso del Fermento amarillo. Según Krebs existen en las células animales, especialmente en el riñón, dos sistemas diastásicos formados por estos fermentos, los cuales conducen siempre a la formación de los cetoácidos con producción de amoníaco; uno de los sistemas actúa solamente sobre los aminoácidos dextrogiros que no son los naturales; el otro sistema, que no puede separarse de las células como el anterior, es el de las levo-amino-ácido-desaminasas, el cual actúa sobre los aminoácidos naturales que son todos levogiros. Merecen citarse la *Acidoglutámicodehidrasa* la cual existe en el músculo y en el hígado, y es una de las pocas del grupo que pueden actuar utilizando al azul de metileno como aceptor de hidrógeno; la Codehidrasa I es necesaria siempre como Cofermento:

$$COOH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH\text{-}NH_2\text{-}COOH \rightarrow COOH\text{-}CH\text{-}_2CH_2\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3$$

El año pasado ha sido objeto de estudio especial, por Warburg y Christian la *dextroaminoácidosidasa* o (dehidrasa). Resulta ser una Proteína inactiva unida a un grupo prostético no protéinico; éste contiene fósforo, produce adenina por hidrolisis ácida y lumiflavina si es en medio alcalino; su peso molecular es = 785 y su fórmula empírica: $C_{27}H_{33}N_9O_{15}P_2$; es un dinucleótido adenínico-aloxacíni-

co, que se diferencia del Fermento amarillo en que éste no tiene más que un mononucleótido aloxacínico y por eso no oxida a los aminoácidos. Por su estructura química es un cuerpo intermedio entre las Codehidrasas (que tienen núcleo adenínico) y el Fermento amarillo (que posee grupo aloxacínico). Su modo de acción es bien sencillo: se hidrogena el núcleo aloxacínico por el amino-ácido y se deshidrogena por el oxígeno molecular. Una molécula del citado dinucleótido puede transferir 1.440 moléculas de O_2 por minuto. La Xantinoxidasa tiene también el mismo grupo prostético antedicho. STRAUB describe otro método distinto para la obtención de esta Diastasa, partiendo de polvo de riñón de cerdo desecado con acetato de metilo y purificando luego por adsorción con alúmina y elución con fosfato amónico; la diastasa es inactiva sino se le agrega una Codiastasa extraída de músculo cardíaco de caballo, que es un polvo amarillo que contiene 20% de flavina. Evidentemente hay todavía alguna confusión acerca de esta diastasa y su Cofermento.

Las Aminoácidocarboxilasas son las responsables de desprender el grupo carbóxilo –COOH de los amino-ácidos. HEINSEN (1936) ha descubierto en el páncreas (pero no en el riñón) la *Tirosincarboxilasa* capaz de transformar a la Tirosina en Tiramina:

$$HO—C_6H_4—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}—COOH \longrightarrow HO—C_6H_4—CH_2—CH_2—NH_2+CO_2$$

Diastasas análogas han sido obtenidas por WERLE (1937) de diversos animales (Caviar, conejos, etc.); son aptas para descarboxilar al triptófano y a la Histidina.

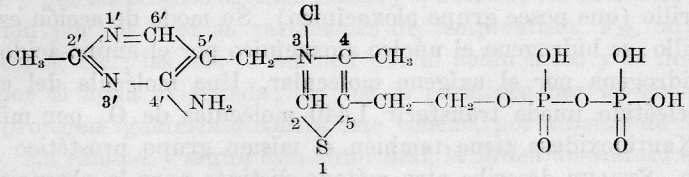
Pero las más interesantes de todas las *Carboxilasas* son las que descarboxilan ácidos diversos no aminados. Entre ellas se encuentra la *Carboxilasa* de NEUBERG que transforma (en la Fermentación alcohólica) al ácido pirúvico en metanal:

$$COOH—CO—CH_3 \longrightarrow COH—CH_3+CO_2$$

se encuentra en la levadura, en diversas plantas y raramente en los tejidos animales. Necesita como activador al ion magnesio; y precisa el concurso de una Codiastasa llamada Cocarboxilasa, la cual posiblemente es el propio grupo prostético de la anterior. Ha sido obtenida cristalizada por LOHMAN, el cual ha determinado exactamente su estructura química; es un Difosfato (Pirofosfato)

de la Vitamina B_1 (Aneurina, Thiamina) y corresponde, por tanto, a la siguiente fórmula de constitución y empírica:

$C_{12}H_{19}O_7P_2SCl$



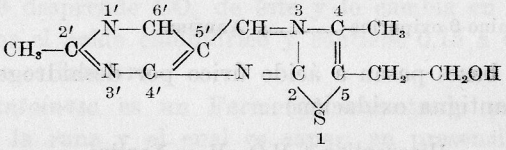
COCARBOXILASA

Uno de los grupos fosfóricos es fácilmente separable por hidrolisis ácida; los dos pueden desglosarse por acciones diastásicas y entonces queda libre la Vitamina B_1. TAUBER ha logrado la síntesis de la Cocarboxilasa calentando una mezcla de esa Vitamina con ácido fosfórico y pirofosfato sódico anhídro, a 155°, y cristalizando varias veces el producto en alcohol-éter. La levadura viva convierte a la Vitamina B_1 en esta carboxilasa (KINNERSLEY y PETERS); y lo mismo la mucosa duodenal (TAUBER). LIPSCHITZ y otros han demostrado que en la síntesis diastásica de la *Cocarboxilasa* con la Vitamina B_1 y ácido fosfórico tiene lugar siempre una producción de energía derivada de la dismutación simultánea entre triosafosfato y ácido pirúvico; el fluoruro sódico inhibe la síntesis si ésta se lleva a cabo con etiocimasa, hexosadifosfato, extracto de tejido muscular hervido y Vitamina B_1, pero *sin* ácido pirúvico. La acción de la *Cocarboxilasa* sobre el ácido pirúvico no puede suplirse por la Vitamina B_1 libre ni tampoco por su ester monofosfórico, ni por el adenosintrifosfato ni por la hexosadifosfato ni por la Glutathiona. Se inhibe por la presencia de aldehidos y se activa por la de sales de magnesio y de manganeso; también es activador el cianuro sódico, lo cual prueba que no forma parte de la diastasa ningún metal. MOLNAR ha demostrado la necesidad del grupo fosfórico, cuya unión al resto de la molécula es determinada especialmente por la Corticosterona (una de las hormonas de la corteza de las glándulas suprarrenales); muchas de las acciones atribuídas a la Vitamina B_1, especialmente en las neuralgias del trigémino, son debidas a esta Cocarboxilasa.

La acción de la *Cocarboxilasa* está perfectamente definida en la fermentación de la glucosa con el concurso de la levadura; pero

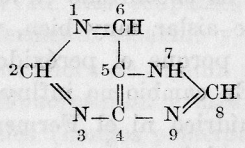
no sucede lo mismo con su modo de actuar en el metabolismo animal, especialmente en el músculo en donde se forma ácido láctico y no alcohol como producto final de la glucolisis. Muchas de las acciones atribuídas a la Aneurina se deben a la Diastasa que nos ocupa; no nos compete aquí la discriminación correspondiente.

Un método de determinación cuantitativa de *Cocarboxilasa*, conjuntamente con Aneurina (Vitamina B_1) ha sido ideado por WESTENBRINK y JANSEN; se adsorbe la Vitamina de la mezcla con Frankonita, y se eluye con metanol y hidrato sódico al 30%, y se oxida con ferricianuro potásico; el tiocromo así producido se extrae con isobutanol alcalino más metanol; la Cocarboxilasa no se extrae por este disolvente y queda en la capa acuosa pero transformada también en tiocromo; la medida de fluorescencia en las dos capas permite determinar las cantidades respectivas de Vitamina B_1 y de Cocarboxilasa. El *Tiocromo* es una substancia cristalina amarillo pálida, con fluorescencia azul, que fué primeramente aislada de la levadura por KUHN y colaboradores; se produce a partir de la Vitamina B_1 o de su pirofosfato por deshidrogenación del grupo amínico NH_2 del núcleo pirimídico y del metino del núcleo tiazólico de la molécula de esos cuerpos con pérdida de ClH; su fórmula de constitución ha sido elucidada por diversos investigadores (BARGER, KUHN, WINDAUS, etc.), y es la siguiente:



THIOCROMO

Las *Purino-dehidrasas* ejercen su acción sobre las llamadas "bases púricas" porque todas derivan del núcleo fundamental de la Purina de FISCHER:

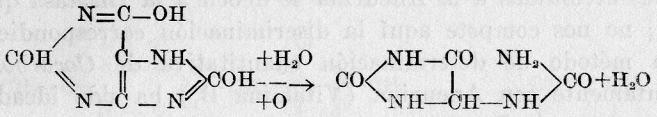


PURINA

HIPOXANTINA
6-Oxipurina
XANTINA
2-6-Dioxipurina
ACIDO ÚRICO
2-6-8-Trioxipurina

ADENINA
6-Aminopurina

GUANINA
2-Amino-6-Oxipurina



Acido úrico Alantoina

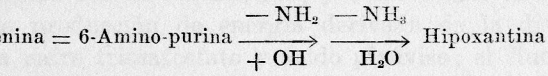
La substitución de hidrógeno por oxhídrilo en cada uno, en dos o, en los tres eslabones carbonados 2, 6 y 8, da las fórmulas de constitución de estas bases, de las cuales las más importantes son:

Hipoxantina = 6-oxipurina

Xantina = 2-6-Dioxipurina

Acido úrico = 2-6-8-Trioxipurina

Las dos primeras se producen por la acción de las respectivas Nucleinaminasas (Adenasa y Guanasa del hígado) sobre las bases aminadas correspondientes y como vimos al ocuparnos de ellas:



Guanina = 2-Amino-6-oxipurina ⟶ Xantina

Estas dos bases pasan a ácido úrico por deshidrogenación con hidratación (antigua oxidación):

Hipoxantina + H_2O—H_2 = Xantina

Xantina + H_2O—H_2 = Acido úrico

La Diastasa que ejerce esta acción es la *Xantinodehidrasa*, que se encuentra en todos los vertebrados; en el hombre y en los monos está localizada en el hígado, pero en los rumiantes está repartida por todos los órganos; no se ha encontrado en los invertebrados ni en la levadura. Se puede aislar muy bien, pero es muy sensible a la acción del oxígeno porque el peróxido de oxígeno que se forma casi la destruye. En cambio no influyen sobre ella ni la Catalasa ni el ácido cianhídrico ni el Fermento amarillo. Su acción es reversible y el ácido úrico pasa en parte a xantina

por su influjo estableciéndose, por tanto, un equilibrio químico el cual no se vence más que introduciendo en el sistema un nuevo aceptor de hidrógeno, como por ejemplo el azul de metileno.

No es de una especificidad estricta, puesto que puede actuar sobre diversas bases púricas, habiéndose probado hasta hoy que es capaz de deshidrogenar (con hidratación previa) a nueve de ellas, entre las cuales se encuentran la 8-oxipurina, la 6-amino-2-oxipurina y la 6-amino-8-oxipurina. Además esta *Xantinoxidasa* ejerce una influencia general sobre todos los aldehidos, pasándolos a ácidos; actuando como una Dehidrasa general.

Algunos autores, como Both, admiten que esta Diastasa es idéntica con la de Schardinger y que ya consideramos antes, pero las pruebas en pro de este supuesto no son definitivas.

La *Uricasa* es la Diastasa responsable de la oxidación del ácido úrico (producido a su vez, como acabamos de ver, por oxidación de xantina y de hipoxantina) pasándolo a alantoina a través de un cuerpo intermedio.

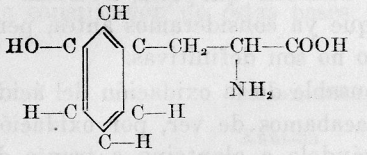
No existe en nuestro organismo y de ahí la incapacidad de éste para transformar su ácido úrico; pero se encuentra en el hígado del cerdo, del caballo, de diversos roedores, de peces y de anfibios; y también en la simiente de soja y en algunas bacterias. Es muy específica. A $P_H = 8{,}9$ transforma al ácido úrico en el citado cuerpo intermedio (ácido oxiacetileno-diureincarbónico) y a $P_H = 9{,}9$ desprende CO_2 de éste y lo cambia en alantoina. Se inactiva por el ácido cianhídrico y contiene 0,15 a 0,20% de hierro, aunque es incolora.

La *Alantoinasa* es un Fermento encontrado por Przylecki (1924) en la rana y el cual es capaz, en presencia de oxígeno, de transformar a la alantoina en urea, amoníaco y, verosímilmente, ácido oxálico.

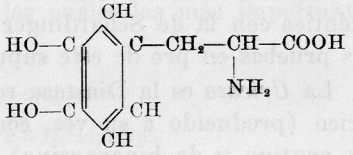
El grupo de las *Oxidasas* ha quedado considerablemente reducido, porque ya dijimos que la mayor parte de los Fermentos contenidos en él han pasado al de las Dehidrasas. De las que todavía se conservan, nos ocupamos antes de la *Indofenoloxidasa* al hablar del Fermento amarillo y de la *Citocromoxidasa*.

Trataremos ahora de alguna más. La *Monofenoloxidasa* llamada también *Monofenolasa* y más corrientemente *Tirosinasa*; existe en los vegetales (hongos principalmente) y en los animales (especialmente en los insectos). Su acción no es específica, puesto

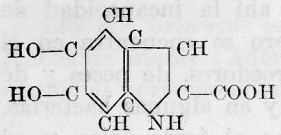
que se ejerce sobre cualquier substrato monofenólico (salvo el guayacol) y sobre muchos Polifenólicos. Uno de sus nombres lo toma por su acción sobre la Tirosina a la cual transforma, según RAPER (1923), en Dioxifenilalanina (llamada por abreviación *Dopa*), luego en ácido Dioxiindolcarbónico y finalmente en Dioxiindol; este último cuerpo se isomeriza para pasar a compuesto quinónico rojo, el cual a su vez se polimeriza para originar finalmente un polvo negro insoluble, tan análogo a las melaninas naturales que se supone que éstas se forman en los organismos por un proceso idéntico al descrito:



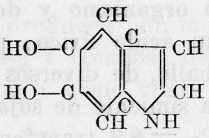
TIHOSINA



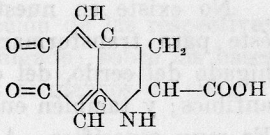
DOPA



Acido Dioxi-indol-carbónico



Dioxi-indol



SUBSTANCIA ROJA

Pero esta explicación no es la única y merecen citarse aquí todas las que pretenden demostrar la formación y origen de Melaninas, a partir siempre de Tirosina como primer materia. G. BERTRAND, estudiando la formación de la laca, pudo observar que el latex del árbol que la produce tiene una substancia fenólica, el lacol, la cual se oxida y oscurece en presencia de una diastasa allí existente, la *Lacasa,* y con el concurso del oxígeno del aire y de un agente catalítico, el manganeso; después se ha visto que muchos cuerpos fenólicos pueden oxidarse y polimerizarse, ennegreciéndose, por la acción de una oxidasa llamada en términos generales *Fenolasa.* Si el substrato es un monofenol, la Diastasa se denomina *Monofenolasa;* y en el caso concreto del amino-ácido Tirosina (que tiene función monofenol) se llama *Tirosinasa;* si se trata de un polifenol el Fermento es una Polifenolasa y en el caso del Lacol, tenemos la Lacasa; de estos fermentos nos ocuparemos enseguida

La *Tirosinasa* se encuentra muy difundida entre vegetales (el Hongo *Russola nigricans*, la patata, el grano de trigo, la manzana, etc.) y animales (*Tenebrior molitor* o insecto de las harinas, bolsa de tinta del calamar y la sepia, etc.); el color negro que se produce al cortar algunas frutas o al pescar ciertos cefalópodos, es debido a Melaninas originadas por oxidación de la Tirosina con la Tirosinasa allí presente; esta Diastasa parece ser un complejo de tres: Una descarboxilasa, una desaminasa y una genuina oxidasa; la acción conjunta de las tres cambia a la Tirosina en aldehido oxifeniletílico:

$$2\ OH\text{-}C_6H_4\text{-}CH_2\text{-}\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}\text{-}COOH \xrightarrow[O]{+\ H_2O} 2\ NH_3 + 2CO_2 + 2OH\text{-}C_6H_4\text{-}CH_2\text{-}COH$$

desprendiéndose amoníaco y anhídrido carbónico. Ese aldehido, así producido, es considerado por O. v. FÜRTH como el cromógeno de las melaninas, las cuales se producen por su ciclisación seguida de polimerización; los hechos observados de encontrarse siempre Tirosina y Tirosinasa en donde se produce Tirosina vienen en apoyo de esta teoría. Otros autores (BLOCH) suponen que la Tirosina se transforma primeramente en *Dopa* (véase antes), en virtud de una diastasa especial y demostrada, que se llama *Dopa-oxidasa;* la *Dopa* se oxida y polimeriza después o se transforma, como vimos, en Dioxiindofenol y Pigmento rojo. Para más detalles véase J. GIRAL. Melaninas.

La *Tirosinasa* es una genuina oxidasa porque necesita oxígeno que toma del substrato con la ayuda de un sistema en el cual figura un metal pesado; hasta ahora no se conoce ningún Cofermento suyo.

La *Polifenoloxidasa* o *Polifenolasa* (en caso especial *Lacasa*) actúa sobre Polifenoles transformándolos primeramente en Quinonas, las cuales se oxidan a su vez y se polimerizan formando compuestos de color pardo o purpúreo hasta negro. Un ejemplo típico hemos señalado al ocuparnos anteriormente de la Peroxidasa: el Pirogalol, pasando por muchas fases, como vimos, se transforma en Purpurogalina, y WILLSTAETTER establece la unidad diastásica de Peroxidasa, fundándose en esta transformación, la cual la produce este fermento, pero también la Polifenolasa.—Esta última se encuentra en casi todos los vegetales y también en el

músculo cardíaco del caballo y en los leucocitos de muchos animales. Se diferencia de la Monofenoloxidasa en que no ejerce acción sobre Monofenoles; y de la Indofenoloxidasa, que ya estudiamos antes, en que su combinación con óxido de carbono no es disociable por la luz. No se reduce por el Citocromo-c y no produce Peróxido de Hidrógeno al ejercer su función.—Kubowitz ha obtenido muy pura la de la patata y ha podido demostrar el hecho extraordinariamente interesante de que está formada por una Proteína unida a una *sal de cobre* siendo muy análoga al pigmento *Hemocianina* de la cual se diferencia por su actividad especial y por su menor proporción de cobre (menos de 0,2% en vez de 0,26%); sus soluciones, que son amarillentas, se pueden desdoblar en Proteína y sal de cobre, mediante el ácido cianhídrico en medio neutro y dialización subsiguiente; la Proteína aislada resulta inactiva, así como la sal de cobre, pero uniéndolas se sintetiza nuevamente Polifenoloxidasa con su actividad específica. La oxidación que ejerce sobre el substrato (Pirocatequina, Pirogalol, Dopa, Adrenalina, y en general Ortho-difenoles) se determina por el paso de cobre divalente Cu'' a cobre monovalente Cu'.—No oxida a los Polifenoles en posición Para (en general) o Meta tales como la Hidroquinona, Resorcina, ácido ascórbico, etc.—La Polifenolasa de los hongos superiores ha sido obtenida pura por Keilin y Mann; es también un compuesto de cobre pero con mayor proporción de metal que la anterior (0,3%). Los mismos autores han aislado pura la *Lacasa* y resulta ser también cuprífera (0,34% de metal); se diferencia de las anteriores en su color fuertemente azul, en que no se inhibe por óxido de carbono y en que oxida igualmente a difenoles que a diaminas; no oxida a monofenoles (Tirosina, Paracresol, etc.) y se inhibe por cianuros, e hidrógeno sulfurado. Mann y Keilin han aislado de los propios eritrocitos un compuesto proteico-cuprífero cristalino al cual denominan *Hemocupreína;* es de color azul y contiene 0,34% de cobre, 14,35% de nitrógeno y 1,12% de azufre; contiene dos átomos de cobre por molécula.—Los mismos autores aislan del hígado otra cuproproteína no cristalizada, la *Hematocupreína;* tanto ésta como la anterior carecen de propiedades diastásicas y se desconocen todavía sus funciones; las consignamos aquí por ser cuerpos cupríferos albuminóideos como lo son las Polifenolasas antes descritas.

Reciben el nombre de *Hidrógeno-liasas* o *Hidroliasas* las Diastasas que, actuando sobre diversos substratos liberan Hidrógeno el cual *no* se fija sobre el Fermento ni sobre ningún aceptor sino que se libera; tal es p. e. la Formicohidroliasa que actúa sobre el ácido fórmico desdoblándole en hidrógeno y anhídrido carbónico:

$$H—COOH = H_2 + CO_2 .$$

Esta reacción, señalada por HOPPE-SEYLER en 1876, no ha sido estudiada hasta estos últimos años. La Diastasa existe en el *Baccilus Coli* y es distinta de la Carboxilasa y de la Fórmico-dehidrasa que ejercen igual acción sobre el mismo substrato; la Hidroliasa no necesita aceptor pero precisa un activador metálico; su acción se detiene por la presencia de ácido cianhídrico, óxido de carbono, fluoruro sódico y narcóticos.

Las *Hidratasas* fijan una molécula de agua sobre el substrato sin que este se desdoble o escinda. Al ocuparnos de la Sucinodehidrasas mencionamos la más importante del grupo, que es la *Fumarasa,* la cual transforma al ácido fumárico en ácido málico:

$$COH—CH=CH—COOH + H_2C=COOH—CH_2—CHOH—COOH$$

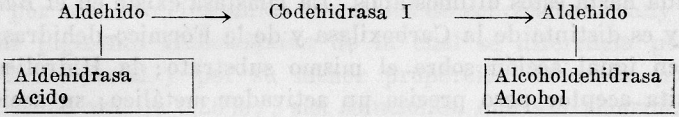
Existe en el músculo y en el hígado principalmente, pero se encuentra muy difundida en casi todos los tejidos vegetales y animales. Es muy sensible en su acción y posee una especificidad muy estrecha, pues no actúa sobre el ácido metilfumárico ni sobre el crotónico.

La *Aldehido-Mutasa, Dismutasa* de *Parnas,* o simplemente *Mutasa,* ha sido obtenida pura y estudiada recientemente por DIXON; se la creyó idéntica a la Aldehidrasa ya considerada antes puesto que transforma al aldehido en alcohol pero en este caso se forma también ácido; es propiamente la responsable de los procesos de Dismutación o de la reacción de CANIZZARO: dos moléculas del aldehido se transforman en una mezcla de alcohol y ácido correspondiente:

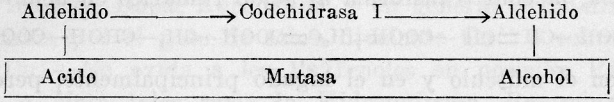
$$R—COH + R—COH + H_2C = R—CH_2OH + R—COOH$$

DIXON ha demostrado plenamente que esta Mutasa es completamente diferente de la Aldehidrasa antes mencionada; entre otras razones porque la Mutasa no actúa sin el concurso de la Codehidrasa I, en tanto que la otra no lo necesita. Como la reacción que determina, de Dismutación, es doble (paso de una molécula de aldehido a alcohol y de otra a ácido) se discute mucho si

en realidad se trata de dos Diastasas diferentes o de una sola con dos focos o centros de atracción. En el primer caso, defendido por DEWAN y GREEN, una Diastasa del par sería la Alcoholdehidrasa cuya acción es reversible e interviene en el paso de aldehido a alcohol y de alcohol a aldehido; la otra sería la Aldehidrasa tantas veces citada; la acción podría representarse por este esquema:

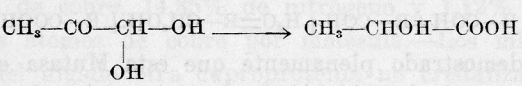


El supuesto de una sola Diastasa (*Mutasa*) defendido por DIXON es mucho más razonable puesto que no se ha podido descubrir ni trazas de Aldehidrasa en las preparaciones de Mutasa; entonces el esquema anterior se cambia por el siguiente:



La llamada *Triosafosfato-mutasa* dismuta también al Triosafosfato (Acido dioxicetona–fosfórico o Acido glicerinaldehido-fosfórico) en ácido α-glicerofosfórico y ácido fosfoglicérico (véase más adelante el capítulo *Glucolisis*); es también una sola Mutasa no diferente de la anterior.

La *Metilglioxalasa* de NEUBERG, llamada también *Cetaldehidomutasa*, existe en el tejido muscular y su actividad determina el paso o transformación del Metilglioxal en ácido láctico. Ya dijimos, y sobre ello volveremos, que esta transformación solamente tiene lugar en presencia y con el concurso del tripéptido llamado *Glutation* (LOHMANN):



Citemos todavía algunas otras Desmolasas de muy difícil clasificación:

La *Histaminasa*, existe en el riñón y en el intestino delgado; actúa sobre la Histamina, posiblemente desprendiéndole una mo-

lécula de amoníaco. Es específica y se considera por algunos autores (ELDBACHER) como un Fermento respiratorio análogo a la Hemina.

La *Tiraminasa* ejerce su acción sobre la Tiramina, posiblemente desaminándola y oxidándola. Como la anterior, está poco estudiada todavía.

La *Aspartasa*, de QUASTEL y WOOLF (1926) actúa sobre el ácido aspártico desaminándolo y deshidrogenándolo a la vez para transformarlo en ácido fumárico:

$$\begin{matrix} COOH—CH—CH_2—COOH \\ \quad\quad | \\ \quad\quad NH_2 \end{matrix} \leftrightarrows COOH—CH{=}CH—COOH + NH_3$$

La acción es reversible y muy específica, puesto que se ejerce solamente sobre el ácido levo-aspártico que es el natural. No actúa sobre los análogos como el metilfumárico, el glutacónico, el aconítico, etc. Contrariamente a la Fumarasa, se encuentra la *Aspartasa* en las Bacterias pero también se ha descubierto en el hígado del perro. La acción inversa de formación de ácido aspártico a partir de fumárico y el amoníaco la ejerce también substituyendo este último por hidroxilamina, pero entonces se origina el ácido oxiaspártico:

$$COOH—CH{=}CH—COOH + NH_2OH \leftrightarrows \begin{matrix} COOH—CH—CHOH—COOH \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad NH_2 \end{matrix}$$

funciona en estos casos como una genuina *Amoniacasa*, habiéndose descubierto algunas otras Diastasas de este tipo por EULER (1934) y por JACOBSOHN (1935); todas ellas son capaces de fijar amoníaco sobre un ácido no saturado para transformarlo en el aminoácido correspondiente:

La *Carbonicoanhidrasa* es la responsable de la descomposición de los bicarbonatos alcalinos desprendiendo anhídrido carbónico de su molécula:

$$2\ CO_3HNa = CO_2 + CO_3Na_2 + H_2O.$$

Aquí el substrato es un cuerpo tenido por inorgánico (aunque siempre carbonado y lógicamente orgánico por ello). No se ha encontrado todavía más que en la sangre de vertebrados, localizada especialmente en los eritrocitos. Por esta razón aumenta su cantidad en los casos de anemia perniciosa; porque la can-

tidad de eritrocitos es menor y se concentra en ellos la total existente en la sangre (HOGSON, 1936).

La *Rodanesa, descubierta por* K. LANG (1933) en el riñón y en el hígado, no existe en la sangre ni en el músculo. Es una diastasa *sintetizante,* capaz de fijar azufre sobre el ácido cianhídrico para pasarlo a tiociánico o rodánico:

$$H—C\equiv N + S = HS—CN;$$

no tiene reversibilidad y, por tanto, no descompone al ácido thiociánico ni a sus sales, los sulfocianuros; su P_H óptimo es 8,3 y los donadores de azufre son, principalmente *in vivo,* el hiposulfito sódico.—La significación biológica de esta Diastasa es todavía desconocida.

La *Luciferasa* es la diastasa determinante de la producción de la materia luminiscente de ciertos organismos animales inferiores; según HARVEY (1920) transforma a la Luciferina en Oxiluciferina fijándose oxígeno en su molécula y separándose hidrógeno. Es, por tanto, una genuina oxidasa. Mencionemos, todavía, a los cuerpos que intervienen en las oxidaciones y reducciones intraorgánicas, pero que no son genuinos Fermentos. Son principalmente compuestos sulfurados (thioles, alcoholes, sulfurados). Los principales son la *Cisteína* y la *Glutathiona*; ambos funcionan en dos formas: una reducida, con los grupos sulfhídrico, SH, de su molécula, libres; otra oxidada o deshidrogenada, con grupos-S-S-H en vez de SH.—Ya nos ocupamos de ellos y de su acción al exponer la teoría de WIELAND para explicar dichos procesos bioquímicos. Actualmente se concede gran importancia a la existencia de esos grupos SH en las moléculas de Diastasas hasta el extremo de que la inactivación reversible de muchas de ellas se hace depender del equilibrio tiol-sulfuro

$$2\ R—SH \leftrightarrows R—S—S—R + H_2$$

que se establece entre la forma oxidada y reducida del Fermento; la forma tiol es siempre la más activa (HELLERMANN). De ahí la importancia de la Cisteína y de la Glutathiona, bien formando parte de la Diastasa o bien coadyuvando a su acción.

Lo mismo decimos también de la acción del ácido ascórbico o Vitamina C.

CASOS ESPECIALES

FERMENTACION ALCOHOLICA Y GLUCOLISIS

HISTORIA.—

Ya indicamos en la primera conferencia la importancia histórica que tiene la Fermentación alcohólica, que es conocida desde la más remota antigüedad. Hasta los tiempos de ARNALDO de VILLENEUVE (1240) no se logró identificar al alcohol como uno de los cuerpos originados en dicha fermentación; entonces se le aisló por destilación y se le caracterizó. Posteriormente LAVOISIER (1789) hizo lo mismo con el anhídrido carbónico y GAY-LUSSAC (1910) estableció la ecuación química que pretendía explicar el fenómeno: $C_6H_{12}O_6 = 2\ CH_3 - COOH + 2\ CO_2$; pero expresó también la necesidad del concurso del aire *no* purificado. CAGNIARD-LATOUR y SCHWANN, descubren al mismo tiempo y al microscopio las células de levadura necesarias para la fermentación. LAVOISIER y más tarde BERZELIUS y LIEBIG pretenden explicar químicamente el proceso de la Fermentación alcohólica. PASTEUR defiende su teoría vitalista y descubre los microorganismos responsables de la acción; encuentra, además, que la Fermentación es una consecuencia de la vida sin oxígeno y descubre la formación de otros diversos cuerpos (glicerina, ácido sucínico, alcohol amílico) durante el proceso fermentativo. El descubrimiento sucesivo de las diversas diastasas que ya hemos estudiado (Alcoholasa de BUCHNER, Invertasa de BERTHELOT) van ampliando el conocimiento de los complejos fenómenos que tienen lugar en esta fermentación aparentemente tan sencillos. Pero ha sido en la época actual en la que se han hecho los descubrimientos más importantes y los estudios más acabados acerca de esta Fermentación. Casi toda la Bioquímica de las Diastasas interviene en ella; los productos intermedios se encuentran por docenas, las formas o variantes pueden ser muy distintas. La sagacidad, la perseverancia y la elevada formación cultural e intelectual de los más eminentes investigadores de todos los países, han sido

puestas al servicio del esclarecimiento de la Fermentación alcohólica. En las páginas siguientes tendremos ocasión de apreciarlo.

Vamos a considerar la *Glucolisis,* que es el desdoblamiento o desmolisis de la glucosa en el interior del organismo animal, en sus tres procesos fundamentales, uno de los cuales abarca las fermentaciones alcohólica y otras, de dicho compuesto. Pocos procesos tendrán tanto interés bioquímico como el de la Glucolisis, que explica todo el metabolismo de los hidratos de carbono.

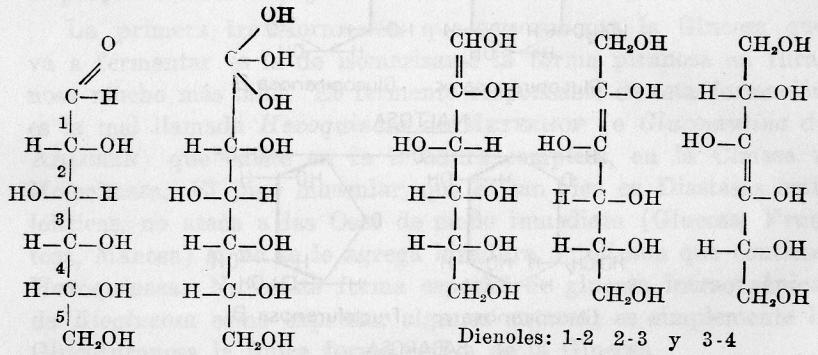
ORIGEN.—

Los *Glúcidos,* elaborados por los vegetales en virtud de su función fotosintética, son introducidos en el organismo animal por vía bucal y experimentan diversas transformaciones a lo largo del tubo digestivo; muchas diastasas, todas ellas Carbohidrasas, intervienen en la hidrolisis de estos compuestos ternarios, los cuales finalmente se resuelven en azúcares sencillos, hexosas y pentosas, aldosas y cetosas; todos ellos son muy solubles en agua, fácilmente difusibles a través de la pared intestinal y, por tanto, absorbibles e incorporados a la sangre de donde son transportados, para su consumo y reserva, (Glucolisis) al tejido muscular principalmente, y, para su reserva solamente, al hígado en donde se almacena al estado de glucógeno en virtud de la función zooamílica o glucogenética de esta glándula; otros dos caminos más puede seguir el monosacárido (Glucosa casi exclusivamente) que ha llegado a la sangre: su transformación en grasas y su eliminación por la orina.

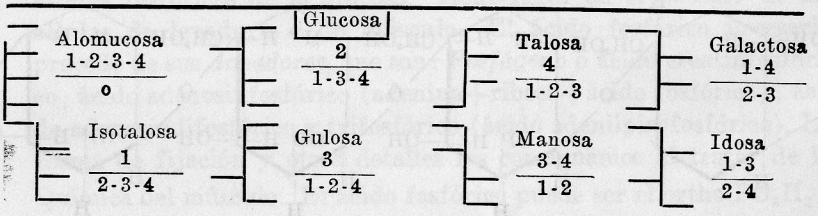
Los Glúcidos alimenticios son la Glucosa misma y alguno de sus isómeros estereoquímicos: Galactosa y Manosa entre las Hexoaldosas; la Fructosa y la Sorbosa entre las Hexocetosas; la Inosita entre las Ciclosas; la Sacarosa, Lactosa y Maltosa entre los Disacáridos; la Xilana y las materias pécticas y los mucílagos vegetales entre las Pentosanas y Hexosanas; las Dextrinas, almidones, Celulosa, Glucógeno e Inulina entre los Polisacáridos; los Glucósidos diversos entre los Heterósidos; los Acidos nucléinicos y ciertos fermentos (Codehidrasa, Fermento amarillo) y Vitaminas (Aneurina) entre los Glúcidos complejos. Todos ellos se hidrolizan en los actos digestivos y con el concurso de Diastasas diversas cuyo estudio de sus acciones hemos hecho ya. Pero también las *osas* u Holósidos simples pueden tener un origen endó-

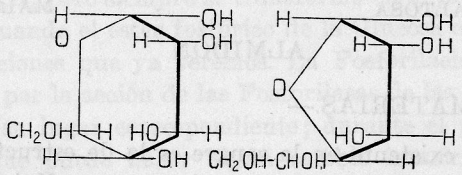
geno (*Gluconeogenia*) y proceder de las substancias grasas del propio organismo (aunque es muy discutida esta procedencia) o de los Prótidos o albúminas que se desdoblan en amino-ácidos muchos de los cuales son glucogenéticos (Glicocola, Alanina, Prolina, Argirina, etc.); o también del desdoblamiento de diversos Glucoproteidos como las mucinas y mucoides animales, los propios nucleótidos, etc.

La estructura química de los *Glúcidos* ha sido esclarecida en estos últimos años. A continuación consignamos las de los más interesantes:



8 Estereoquímicos
3 Enantiomórficos

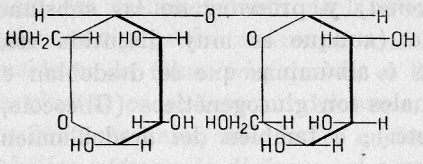




PIRANOSA
Normal - Estable
Oxido de amileno-1-5

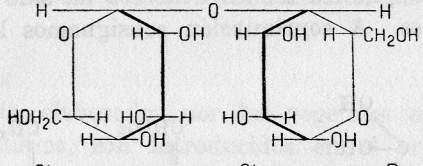
FURANOSA.
Inestable —γ—
Oxido de Butileno-1-4

Cis — Trans — α — β



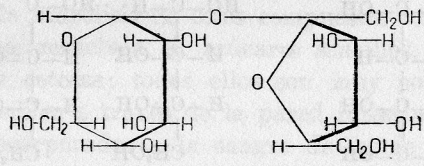
Glucopiranosa β Galactopiranosa β

LACTOSA



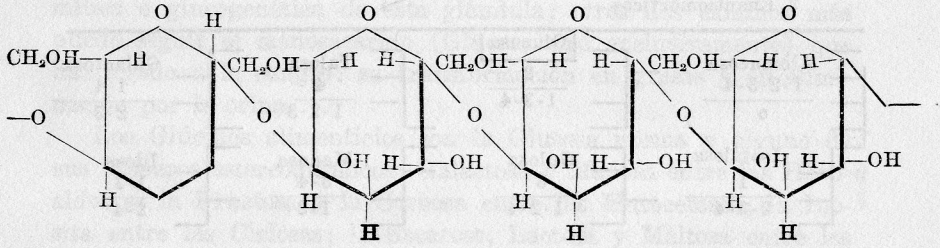
Glucopiranosa ∝ Glucopiranosa β

MALTOSA



Glucopiranosa ∝ Fructofuranosa β

SACAROSA



MALTOSA MALTOSA

ALMIDON

PRIMERAS MATERIAS.—

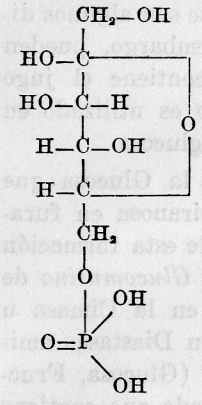
La Glucosa existente en la sangre es la de estructura inestable o furanosa y principalmente en su isomero α. Existe en tres estados bioquímicos: Glucosa actual existente como tal; Glucosa virtual que se halla como disimulada o polimerizada y que pasa a la primera forma por la acción de ciertos reactivos, y Glucosa

Glucídica o Proteica, que se encuentra al estado de Glucoproteidos fácilmente hidrolizable. La cantidad normal es la de 0,9 a 1,1 gr. por litro de suero sanguíneo.

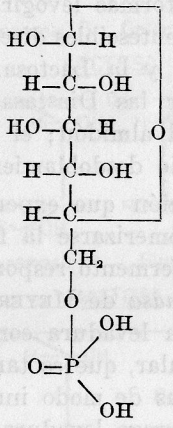
De todos los azúcares sencillos (*Osas*) son fermentescibles únicamente los siguientes: Glucosa, Fructosa, Manosa y Galactosa dextrogiros; no lo son las formas levogiras. Tampoco lo son las Pentosas. Difícilmente fermentescibles directamente son algunos disacáridos como la Sacarosa y la Lactosa. Sin embargo, pueden fermentar directamente por las Diastasas que contiene el jugo muscular, el glucógeno y el almidón; el primero es utilizado en el propio músculo sin previo desdoblamiento en glucosa.

La primera transformación que experimenta la Glucosa que va a fermentar es la de isomerizarse la forma piranosa en furanosa mucho más labil. El fermento responsable de esta formación es la mal llamada *Hexoquinasa* de MEYERHOF (o *Glucomutina* de AHLGREN) que existe en la levadura completa, en la Cimasa u Holocimasa. El jugo muscular, que es tan rico en Diastasas amilolíticas, no ataca a las Osas de modo inmediato (Glucosa, Fructosa, Manosa) si no se le agrega levadura autolizada que contiene Hexoquinasa. No existe forma especial de glucosa intraorgánica, de *Bioglucosa* como expresan algunos autores; es simplemente la Glucofuranosa la única forma activa de la Glucosa.

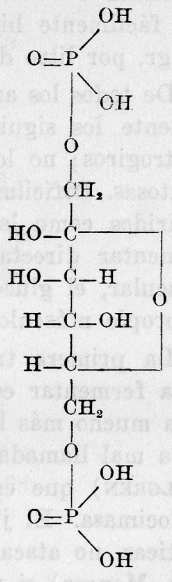
La segunda transformación es la fosforilación o formación de ésteres fosfóricos de la glucosa. Tiene lugar en el *interior* de las células de levadura o de músculo. El ácido fosfórico necesario procede de sus *donadores,* que son: *Fosfágeno* o ácido creatinfosfórico; ácido adenosinfosfórico (adenina+ribosa+ácido fosfórico); ácido adenosindifosfórico y trifosfórico (ácido adenilpirofosfórico). La forma de fijación y otros detalles los consignamos al tratar de la Química del músculo. El ácido fosfórico puede ser el ortho PO_4H_3 o el piro $P_2O_7H_4$ pero siempre se transforma en el primero; se recuperan luego cuando el ester fosfórico de la Glucosa experimenta otras transformaciones que ya veremos. La Fosforilación de la Glucosa tiene lugar por la acción de las Fosforilasas de las cuales nos ocupamos ya en su lugar correspondiente; durante el proceso se ha demostrado que puede haber algún cambio isomérico de Glucosa a Fructosa y viceversa, estableciéndose después un equilibrio entre los dos isómeros. Los ésteres fosfóricos que se forman y que han podido aislarse, son los siguientes:



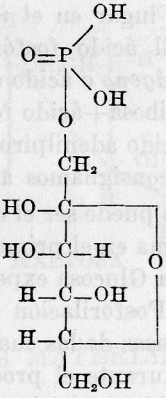
Fructosa-6-Fosfato
Ester de
NEUBERG



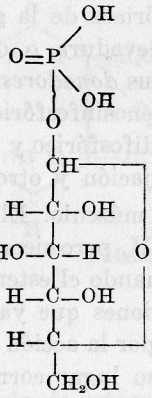
Glucosa-6-Fosfato
Ester de
EMBDEN-ROBISON



Fructosa-1-6-Difosfato
Ester de
HARDEN-YOUNG



Fructosa-1-Fosfato
Ester de
EMBDEN-TANKÓ



Glucosa-1-Fosfato
Ester de
CORI

a los cuales pudieran todavía añadirse los dos ácidos hexosadifosfóricos extraídos del músculo por LOHMANN y de los cuales nos ocuparemos al tratar de los procesos de Lacticogenesis y Lacticolisis.

El que primeramente se descubrió fué el difosfórico de HARDEN-YOUNG (1905) por estos autores en la acción de la levadura sobre el zumo de la uva que contiene glucosa y fructosa; se produce indistintamente a partir de cualquiera de estas dos, las cuales se isomerizan con facilidad; también se produce *in vivo* por la acción del ácido orthofosfórico sobre la Glucosa o sobre un Polisacárido sencillo; o fosforilando los ésteres de NEUBERG o de ROBISON. En este último caso, la Hexoquinasa estimula la difosforilación. El ester difosfórico es muy reductor (lo cual hace pensar en que las moléculas del ácido deben fijarse sobre los grupos oxhidrilos de modo que respeten libre al grupo aldehídico de la Glucosa). No es fermentescible y únicamente se transforma en el ester de NEUBERG por Fosforilasa activada con iones magnesio.

El Glucosa-6-Fosfato es el llamado *Lactacidógeno* por EMBDEN porque supone que es el generador de ácido láctico en el músculo. Posteriormente ha sido descubierto por ROBISON en el hueso y sintetizado por LEVENE. También se ha conseguido transformar al de HARDEN en éste y viceversa. Es fermentescible.

El ester de NEUBERG es el que primeramente se forma, pero pasa enseguida al anterior estableciéndose un equilibrio entre los dos cuando existen del total de ellos 3/4 de la Fructosa-6-fosfato y un cuarto del Glucosa-6-fosfato.

El *Glucosa-1-fosfato,* descubierto por CORI (1937) se obtiene con el extracto muscular en presencia de fosfatos inorgánicos, glucógeno y pequeñas cantidades de ácido adenílico; también a partir del Glucógeno y por síntesis. Es muy inestable porque pasa enseguida a *Glucosa-6-fosfato.*

El *Fructosa-1-fosfato,* de TANKÓ y EMBDEN procede de la parcial desfosforilación del Fructosa-1-6-difosfato por la Fosfatasa del hueso descubierta por ROBISON.

Para la formación (y también para la hidrolisis) de estos ésteres fosfóricos se precisa no solamente la acción de las Fosfo-

rilasas sino también las de diversos Cofermentos; recordemos al Fermento amarillo y a la Codehidrasa I.

PROCESOS DIVERSOS.—

El desdoblamiento *in vivo* de la Glucosa (mejor de sus ésteres fosfóricos antes descritos) puede seguir tres procesos: *Oxidativo, alcohólico* y *láctico*. El primero consiste en la combustión total y utilización directa de la Glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 = 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

tiene lugar dentro de las células de los tejidos y necesita, indispensablemente el concurso del oxígeno del aire; es decir, que es un proceso oxibiótico o aerobio. De todos modos deben producirse muchos cuerpos intermedios y, posiblemente, se llega a alcohol y a ácido láctico, los cuales se oxidan en la fase final.

Los otros dos procesos se caracterizan por ser anoxibióticos o anaerobios hasta las fases finales (alcohol, ácido láctico) las cuales se oxidan posteriormente.

El proceso oxidativo no es nunca total o completo. Ya PASTEUR probó que solamente la mitad de la glucosa lo sufre en tanto que la otra mitad se transforma a beneficio de la primera dando productos que sirven para reconstruir las células. La primera mitad es *energética* en tanto que la segunda es *plástica* puesto que parte de la glucosa se transforma en prótidos, lípidos y polisacáridos condensados.

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.—Ya hemos dicho que es proceso *anoxibiótico* y, prescindiendo de cuerpos intermedios, la reacción que tiene lugar y que se llama de GAY–LUSSAC, se expresa por la siguiente ecuación química:

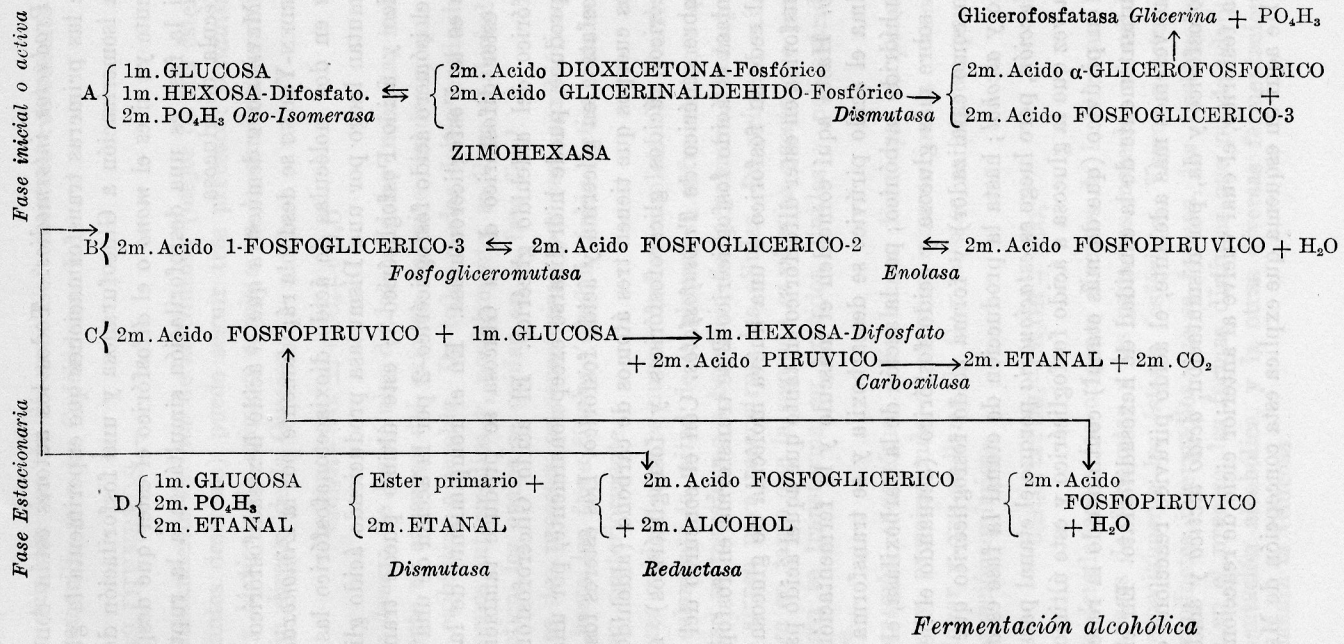
$$C_6H_{12}O_6 = 2\ CH_3—CH_2OH + 2\ CO_2$$

Hemos considerado antes los orígenes diversos de la Glucosa, los azúcares capaces de fermentar y las primeras materias adecuadas para ello, especialmente los ésteres fosfóricos. Vamos a estudiar ahora los productos intermedios que se forman, las diastasas que intervienen en el proceso, las formas distintas que puede adoptar dicha fermentación alcohólica, y la otras diversas fermentaciones que experimenta la Glucosa.

Productos intermedios.—Todos los autores están conformes en que las primeras transformaciones que experimenta la glucosa son una isomerización a Glucofuranosa y una fosforilación de ésta. Se discute ya si es el *mono* o el *di*fosfórico el ester que después actúa y si la fase es una desfoforilación simultánea a la ruptura de la molécula de glucosa.

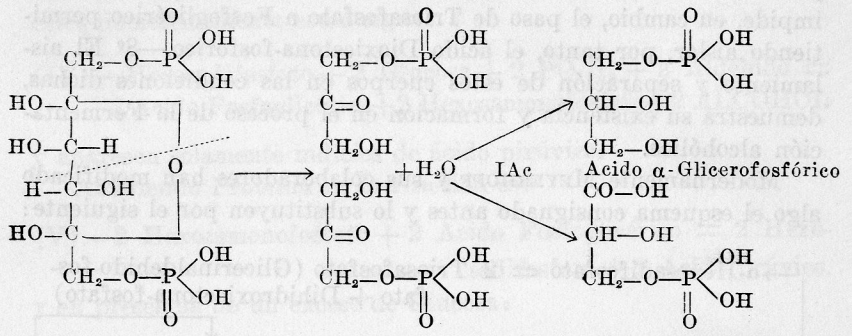
MEYERHOFF demuestra que el ácido hexosadifosfórico o ester de HARDEN-YOUNG se desdobla rápidamente por la *Zimohexasa* o *Aldolasa* en dos moléculas de ácido dioxiacetonafosfórico las cuales se dismutan luego por una Dismutasa produciendo ácido glicerin–fosfórico y ácido Fosfoglicérico-3; este último puede transformarse en el isómero ácido fosfoglicérico–2 por la acción de una isomerasa que es la Fosfogliceromutasa. En el rompimiento de la molécula del ester difosfórico de la Glucosa se produce también el ester fosfórico del aldehido glicérico. El ácido Glicerofosfórico-α que se produce, puede hidrolizarse excepcionalmente, por una α–Glicerofosfatasa en glicerina y ácido fosfórico. Los ésteres fosfóricos de estos cuerpos que tienen tres átomos de carbono (aldehido y cetona glicéricos, ácidos glicerofosfóricos y fosfoglicéricos) reciben el nombre genérico de *Triosafosfatos.* Con el concurso del Fermento Enolasa el ácido fosfoglicérico–2 se transforma en fosfopirúvico el cual cede su fosfórico a una nueva molécula de glucosa a la cual transforma en ester difosfórico en tanto que aquel ácido pasa a pirúvico. Hasta aquí coinciden el músculo y la fermentación; en esta última el ácido pirúvico se descarboxila y se transforma en etanal y anhídrido carbónico; por la acción de la Carboxilasa, el etanal actúa sobre más glucosa y ácido fosfórico (actuando el hexosadifosfato como catalizador) y forma ácido fosfoglicérico que vuelve al ciclo y *alcohol*; hasta la producción de etanal la fase es *activa* o de *inducción,* pero luego es *estacionaria* porque el etanal pasa a alcohol a la vez que la glucosa a ácido fosfoglicérico y este último se desdobla en pirúvico (que da más etanal) continuando la reacción independientemente de la cantidad de hexosadifosfato. En el músculo, como veremos más adelante, el ácido pirúvico reacciona con el glicerofosfórico y da, por dismutación, *ácido láctico* y ácido dioxicetona fosfórico, el cual vuelve al anterior ciclo de reacciones.

He aquí un esquema que explica esta concepción de MEYERHOFF:



ESQUEMA DE MEYERHOF

Las fases sucesivas y cuerpos que se forman se explican en los esquemas y fórmulas representativas siguientes:

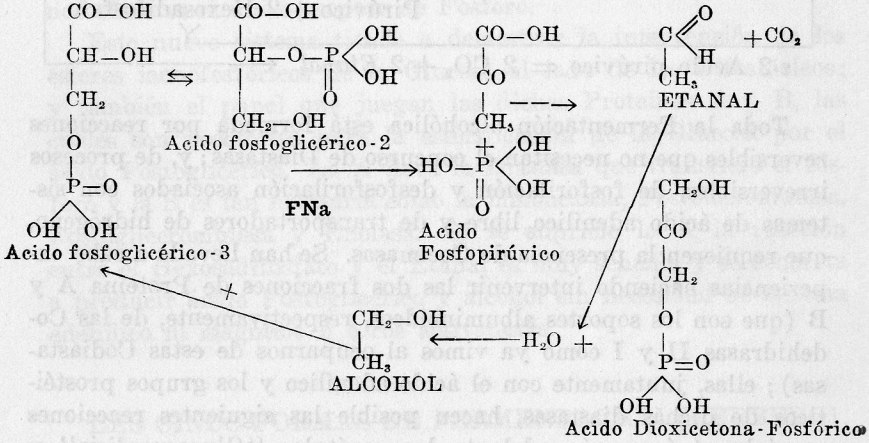


Fructosa-1-6-Difosfato Ester de HARDEN-YOUNG

Acido Dioxicetona-Fosfórico

Acido Fosfoglicérico-3.

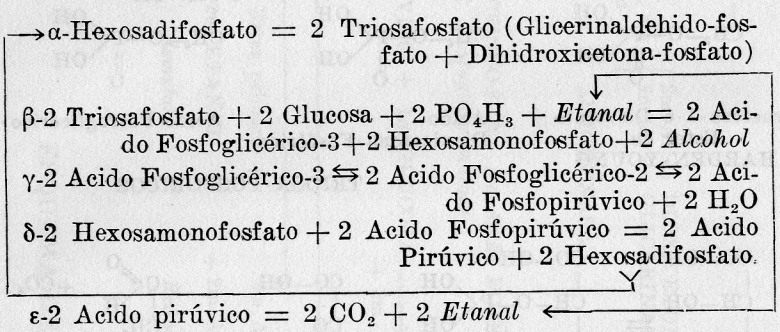
TRIOSA-FOSFORICOS



Las pruebas de este razonamiento están: 1º En que aldehido y cetona glicéricas *libres no fermentan.*—2º El ácido fosfoglicérico se ha aislado y se ha reconocido que es una mezcla de los isómeros *Levo–3* y *Dextro–2,* la cual se cambia encimáticamente en ácido fosfopirúvico.—3º El ácido Glicerinaldehido-fosfórico se obtiene por síntesis y únicamente fermenta el isómero α.—4º No interviene el metilglioxal, aunque se forme como veremos más adelante.—5º Exis-

ten diastasas demostrables para todas las transformaciones citadas. —6º Los fluoruros impiden el paso de ácido Fosfoglicérico a Fosfopirúvico lo cual permite aislar al primero.—7º El ácido iodoacético impide, en cambio, el paso de Triosafosfato a Fosfoglicérico permitiendo aislar, por tanto, el ácido Dioxicetona-fosfórico.—8º El aislamiento y separación de estos cuerpos en las condiciones dichas, demuestra su existencia y formación en el proceso de la Fermentación alcohólica.

Modernamente MEYERHOFF y sus colaboradores han modificado algo el esquema consignado antes y lo substituyen por el siguiente:



Toda la Fermentación alcohólica está formada por reacciones reversibles que no necesitan el concurso de Diastasas; y, de procesos irreversibles, de fosforilación y desfosforilación asociados con sistemas de ácido adenílico libre y de transportadores de hidrógeno, que requieren la presencia de Cocimasas. Se han llevado a cabo experiencias haciendo intervenir las dos fracciones de Proteína A y B (que son los soportes albuminoideos, respectivamente, de las Codehidrasas II y I como ya vimos al ocuparnos de estas Codiastasas); ellas, juntamente con el ácido adenílico y los grupos prostéiticos de dichas diastasas, hacen posible las siguientes reacciones parciales (véase más adelante los capítulos "Glucogenolisis" y "Sistema de Fosforilación"):

(I).—Hexosamonofosfato + 2 Etanal + H_2O = Acido pirúvico + Acido Fosfoglicérico + 2 ALCOHOL

(II).—Hexosamonofosfato + PO_4H_3 = Hexosadifosfato + H_2O

(III).—2 Hexosamonofosfato + PO_4H_3 + 2 Etanal = Hexosadifosfato+Acido Pirúvico+Acido Fosfoglicérico+2 ALCOHOL.

Reemplazando la Hexosamonofosfato por Glucosa y Hexosadifosfato, la reacción va más rápidamente hasta que se gasta todo el ácido fosfórico. Retirando Proteína A del sistema, la reacción se produce estequiométricamente como sigue:

(IV).—Hexosadifosfato + 2 Glucosa + 2 PO_4H_3 + 2 Aldehido = 2 Acido Fosfoglicérico + 2 Hexosamonofosfato + 2 ALCOHOL

y aparecen solamente indicios de ácido pirúvico.

Añadiendo Proteína A, la reacción es:

(V).—2 Hexosamonofosfato + 2 Acido Fosfoglicérico = 2 Hexosadifosfato + 2 Acido prúvico.

y en presencia de un exceso de Glucosa:

(VI).—Glucosa + 2 Acido Fosfoglicérico = Hexosadifosfato + 2 Acido Pirúvico.

Si hay un defecto de Hexosadifosfato, se forma éste con Proteína A según la reacción (IV) que es reversible. El Hexosamonofosfato es el único aceptor de Fósforo.

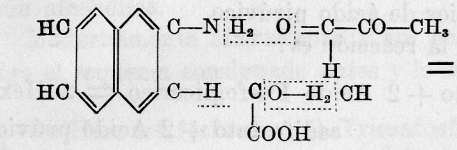
Este nuevo sistema tiende a demostrar la intervención de los ésteres monofosfóricos de la Glucosa al lado de los Difosfóricos; y también el papel que juegan las dichas Proteínas A y B, las cuales son necesarias para la esterificación de la Glucosa por el ácido Fosfoglicérico. La A lleva la Diastasa que transfiere el fósforo y la B es tan necesaria como la Zimohexasa, Fosfohexomutasa, Fosfogliceromutasa y Enolasa. Si se suprime la A la reacción entre el Hexosadifosfato y el Etanal es muy sencilla y se concreta a producir ácido Fosfoglicérico y alcohol sin necesidad de sistema adenílico ni magnesio u otros activadores.

LAS CINCO FORMAS DE FERMENTACION (NEUBERG).

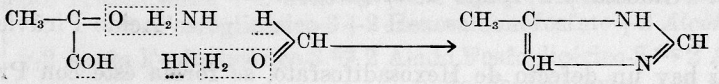
—Neuberg admite la formación indispensable de metilglioxal de cuyo cuerpo derivan luego todos los demás. Meyerhof lo niega primeramente en el músculo y luego en la fermentación. En el músculo porque la glioxalasa no le transforma en ácido láctico más que con el concurso de glutathion; (lo cual ha probado también Lohmann); en la Fermentación porque no fermenta. No niega que se forme, pero no por vía diastásica sino por descomposición

química del ester triosafosfórico extremadamente labil cuando es entorpecida la dismutación normal de este cuerpo.

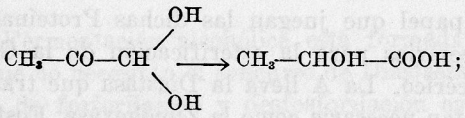
Pero el metilglioxal existe y se ha aislado y caracterizado por la reacción Döbner que da con β-naftilamina y ácido pirúvico un ácido naftocincónico insoluble y cristalino; y con NH_3 y matanal, una metilimidoazol:



β-Naftilamina

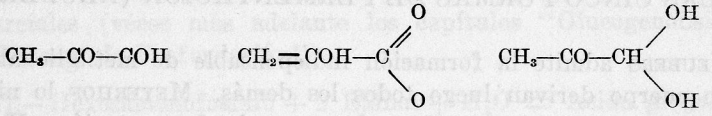


Y se ha aislado también la *metilglioxalasa* (Dakin y Dudley) que lo transforma en láctico:

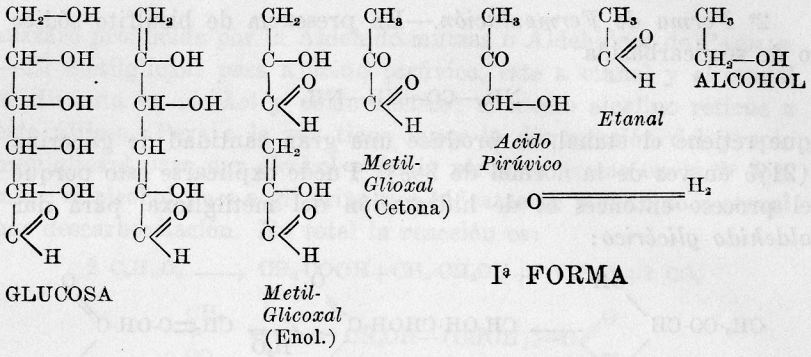


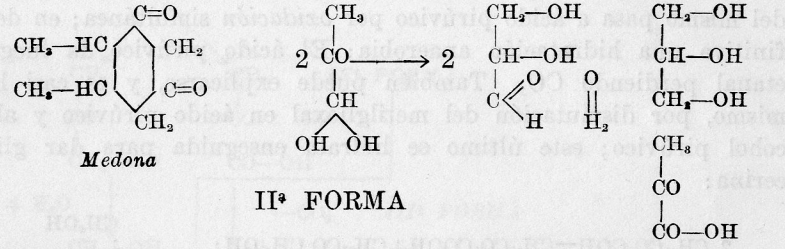
y la glioxalasa, que es una oxidasa, que lo pasa a pirúvico: $CH_3—CO—COOH$; la primera en músculo y la segunda en fermentación.

Admitida la existencia primera del metilglioxal, éste puede actuar en una de sus tres formas: cetónica, enólica e hidrato:



1º *Forma de fermentación.—Glucosa* pasa a *metilglioxal* por simple deshidratación; la reacción es reversible y se puede formar glucosa y almidón a partir de metil-glioxal; la produce la *glicolasa.*





El *metilglioxal* pasa a *ácido pirúvico* por oxidación mediante la Glioxalasa; éste se descarboxila (por la carboxilasa aislada por NEUBERG) y da *etanal* que se *hidrogena* para dar *alcohol*. Todo es proceso de oxidorreducción y en definitiva hidratación, pues no necesita más que H_2O y puede ser *anaerobio*.—En resumen resulta la *reacción de* GAY-LUSSAC:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\ CO_2 + 2\ CH_3—CH_2OH.$$

En el músculo se forma ácido láctico por hidratación del metilglioxal (una verdadera dismutación interna producida por una dismutasa):

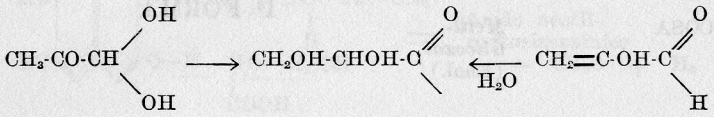
$$CH_3—CO—COH \xrightarrow{H_2O} CH_3—CHOH—COOH$$

o por paso primeramente a ácido pirúvico, por oxidación y luego *reducción* de éste a láctico. El primer proceso lo hace la metilglioxalasa en presencia de glutathion; el segundo lo hace la glioxalasa y luego una hidrasa.

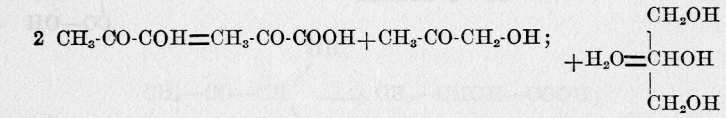
2º *Forma de Fermentación.*—En presencia de bisulfito sódico o de semicarbazida

$$NH_2—CO—NH—NH_2$$

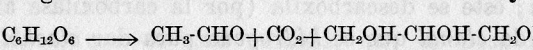
que retiene el etanal, se produce una gran cantidad de glicerina (21% en vez de la normal de 2%). Puede explicarse esto porque el proceso entonces es de hidratación del metilglioxal para dar *aldehido glicérico*:



este aldehido pasa a glicerina por *hidrogenación* a la vez que parte del mismo pasa a ácido pirúvico por *oxidación* simultánea; en definitiva una hidratación anaerobia: El ácido pirúvico da luego etanal perdiendo CO_2. También puede explicarse, y es casi lo mismo, por dismutación del metilglioxal en ácido pirúvico y alcohol pirúvico; este último se hidrata enseguida para dar glicerina:



En total la segunda forma no da alcohol sino etanal y glicerina:



En la práctica, el bisulfito se une también con el ácido pirúvico (por su grupo cetónico) y le impide pasar a etanal.—Se le substituye por *Dimedon*=Dimedona=Dimetilciclohexanodiona=Dimetilhidroresorcina

$$(CH_3)_2C_6H_6O_2 :$$

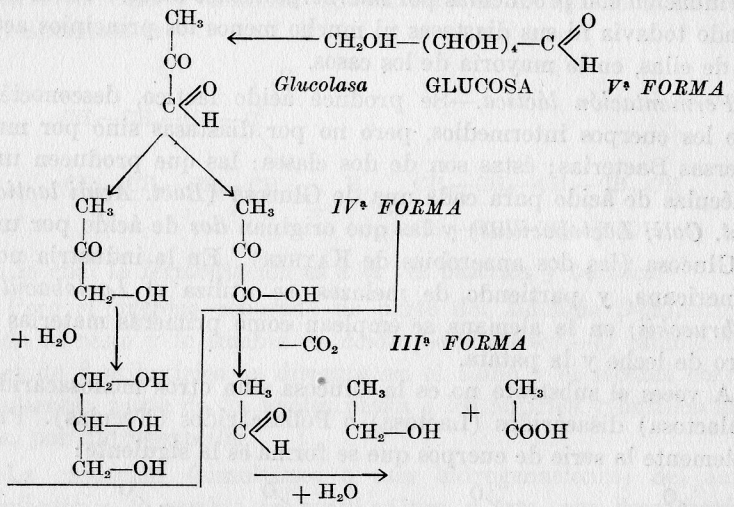
que da aldomedona con el metilglioxal pero no reacciona con el ácido pirúvico.

Esta forma de fermentación se ha utilizado durante la guerra para fabricar glicerina.

3ª *Forma de Fermentación.*—Tiene lugar en medio alcalino: Carbonatos, fosfatos y oleatos alcalinos.—Hidratos de aluminio, magnesio o zinc.—Fundamentalmente es una dismutación de Ca-

nizzaro producida por la Aldehido-mutasa o Aldehidasa de PARNAS. —El metilglioxal pasa a ácido pirúvico, éste a etanal y el etanal se dismuta en *alcohol* y ácido acético; el medio alcalino retiene a este último. Pero a la vez tiene lugar la dismutación del propio metilglioxal para dar alcohol y ácido pirúvico (como en la 2ª forma); el alcohol pasa a glicerina por hidratación y el ácido a etanal por descarboxilación. En total la reacción es:

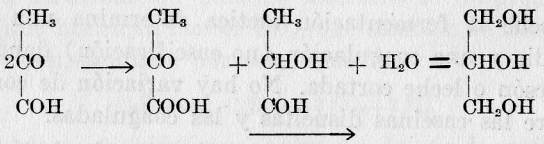
$$2\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + CH_3\text{-}CH_2OH + 2\ C_3H_8O_3 + 2\ CO_2$$



4ª *Forma de Fermentación.*—Si se dificulta la acción de la carboxilasa llevando la Fermentación a un P_H=6-7 y en presencia de MgO y de PO_4HNa hay una acumulación de *ácido pirúvico* y de *glicerina* en proporciones equimoleculares:

$$C_6H_{12}O_6 = CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH_2OH$$

Es también una óxido-reducción o hidratación porque el metilglioxal, término fundamental, se dismuta en ácido y alcohol pirúvico; este último, hidratado, da glicerina:



En total:

$$C_6H_{12}O_6 = CH_3\text{—}CO\text{—}COOH + CH_2OH\text{—}CHOH\text{—}CH_2OH.$$

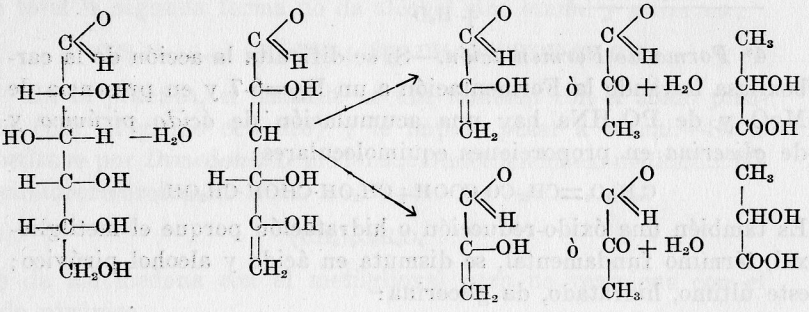
5ª *Forma de Fermentación.*—Si se suprime la Cocimasa y actúa solamente la Apocimasa no hay fosforilación de la glucosa y, por tanto, dismutación del metilglioxal. Pero la Apocimasa tiene Glicolasa que desdobla la glucosa simple en dos moléculas de hidrato de metilglioxal sin formación intermedia de aldehido y cetona glicéricas:

$$C_6H_{12}O_6 = 2H_2O + 2CH_3—CO—COH \ .$$

Otras Fermentaciones de la Glucosa.—Las que se describen a continuación son producidas por *microorganismos vivos.*—No se han aislado todavía ni sus diastasas ni mucho menos los principios activos de ellas, en la mayoría de los casos.

Fermentación láctica.—Se produce ácido láctico, desconociéndose los cuerpos intermedios, pero no por diastasas sino por muy diversas Bacterias; éstas son de dos clases: las que producen una moléculas de ácido para cada una de Glucosa (*Bact. Acidi lactici; Bact. Coli; Lactobacillus*) y las que originan *dos* de ácido por una de Glucosa (las dos anaerobias de Kayser). En la industria norteamericana, y partiendo de melazas, se utiliza el *Lactobacillus Delbrueckii;* en la alemana se emplean como primeras materias el suero de leche y la patata.

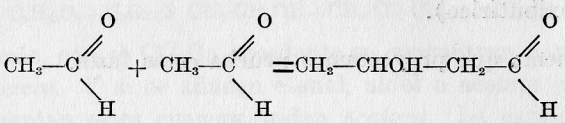
A veces el substrato no es la Glucosa sino otros monosacáridos (Galactosa) disacáridos (Lactosa) o Polisacáridos (Féculas). Probablemente la serie de cuerpos que se forma es la siguiente:



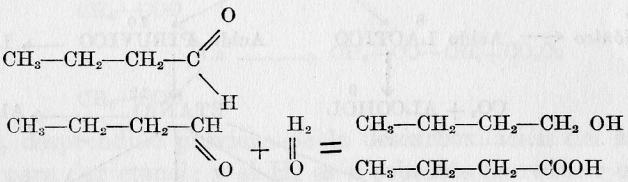
En la leche la fermentación láctica determina una acidificación del medio y una coagulación (no caseificación) dando la cuajada o requesón o leche cortada. No hay variación de composición química entre las caseínas disueltas y las coaguladas.

Fermentación butílica.—Producida por bacterias butíricas anaerobias. (*Bacillus macerans, Granulobacter,* etc.)

La serie de transformaciones es la conocida hasta el término del etanal (glucosa, metilglioxal, ácido pirúvico, etanal). Este se aldoholiza y da el aldehido β-oxibutírico:



Ese aldehido por hidrogenación o desoxidación pasa a aldehido butírico el cual se dismuta (Canizzaro) en el alcohol y el ácido correspondiente:



con lo cual la fermentación es a la vez *butírica* y *butílica.*

Pero el oxígeno separado de parte del aldehido β-oxibutírico oxida al resto y lo cambia en *ácido β-oxibutírico.*—O también: el aldehido β-oxibutírico se dismuta en el ácido y el alcohol correspondientes, parte de los cuales pasan a los butírico y butílico simples, por hidrogenación.

La oxidación (simultánea a esas hidrogenaciones) del ácido *β-oxibutírico* lo cambia en acetil-acético y éste, por descarboxilación, da acetona:

$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}CH_2COOH \rightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}COOH \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}COOH \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CH_3 + CO_2$$

Estas transformaciones son muy interesantes *in vivo* pues demuestran el origen de los *cuerpos cetónicos* a partir de carbohidratos (glucosa) o a partir de grasas (ácidos grasos butíricos, acético, etc.)

En esta fermentación butírica anerobia se desprende siempre hidrógeno que burbujea con el CO_2, que también se desprende. En total puede representarse por esta ecuación:

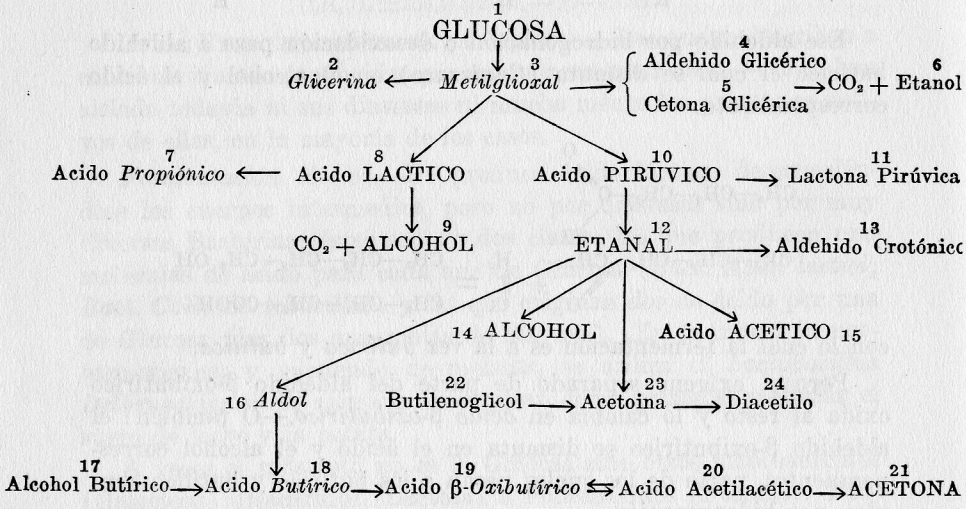
$$C_6H_{12}O_6 = C_4H_8O_2 + 2\,CO_2 + 2\,H_2.$$

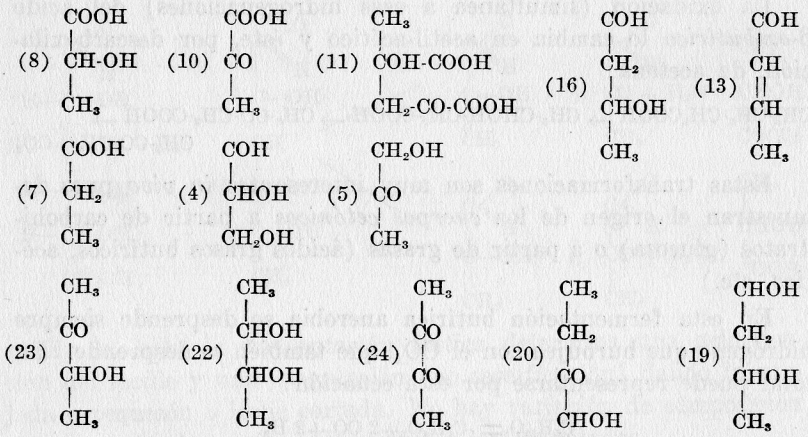
Se supone que este hidrógeno proviene del ácido acético que se forma por dismutación del etanal:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O = 2\,CO_2 + 4\,H_2.$$

Pero también puede proceder de otras fases de la fermentación, como vimos antes (oxidación de aldol a ácido butírico, oxidación de éste a oxibutírico).

El esquema que proyectamos prueba estas fases.



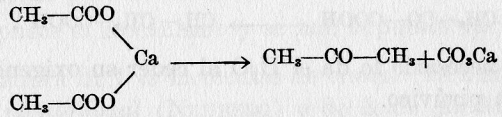


Fermentación acetónica.—Aparte de la producción de acetona en la fermentación butírica, existe otra determinada por el *Bacillus*

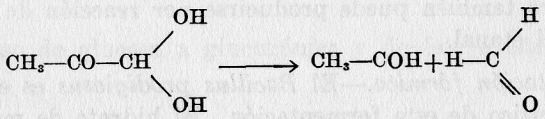
macerans sobre el almidón, sacarosa o glucosa en presencia de CO_3Ca.—Se origina alcohol (2/3) y acetona (1/3) desprendiéndose CO_2 y H_2 :

$$2\ C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2\ CH_3\text{-}CH_2OH + CH_3\text{-}CO\text{-}CH_3 + 5\ CO_2 + 4\ H_2.$$

Pero además, con el CO_3Ca excedente se encuentran *acetato* y *formiato* cálcicos. Y si se añaden etanal, aldol o acetato calcio, *también* fermentan estos cuerpos y dan *acetona*. La explicación más verosímil es la siguiente: al llegar la fermentación al grado *etanal* éste se dismuta en alcohol + ácido acético; éste da acetato cálcico que se descompone en CO_3Ca + acetona:

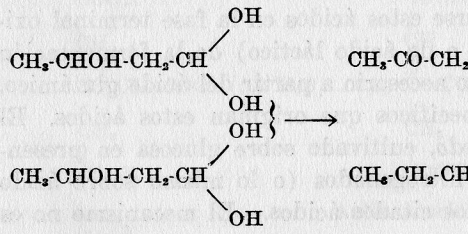


El CO_2 desprendido proviene de la descarboxilación del ácido pirúvico para dar etanal; y el H_2 es el sobrante de reducir el etanal a alcohol. El acetato cálcico viene del ácido acético sobre el carbonato cálcico. El Formiato de calcio proviene lo mismo del ácido fórmico y éste del hidrato de metilglioxal que se desdobla en etanal y fórmico:



La producción de acetona a partir de aldol la hemos visto ya en la fermentación butírica; y la de etanal lo mismo pasando previamente a aldol.

Fermentación acetona-butílica.—Existen bacilos (*Bacillus acetoethylicum*) que dan en medio ácido una mezcla de *acetona* y *alcohol butílico*. El proceso es una especie de reacción de Canizzaro sobre dos moléculas de aldol:



Fermentación propiónica.—El *Bacillus Propionicus* fermenta la glucosa produciendo *ácidos propiónico* y acético. Se produce primeramente ácido láctico y éste por hidratación da acético, CO_2 y H_2; el hidrógeno actúa sobre el ácido láctico y lo reduce a propiónico:

$$CH_3—CHOH—COOH+H_2O=CH_3—COOH+CO_2+2H_2$$
$$CH_3—CHOH—COOH+H_2=H_2O+CH_3—CH_2—COOH$$

Los ácidos láctico y pirúvico sufren la misma fermentación; del primero acabamos de ver la transformación; el segundo pasa a propiónico por reducción (hidrogenación)

$$CH_3—CO—COOH \longrightarrow CH_3—CH_2—COOH\ ;$$

el hidrógeno necesario lo da el H_2O al ceder su oxígeno para pasar metilglioxal a pirúvico.

Fermentación acética.—La genuina acetificación es producida por el *Micoderma aceti* (*Acetobacter aceti* y *Pasteurianum*) sobre el alcohol; y es fundamentalmente aerobia (vino y vinagre-Pasteur). En realidad no es fermentación de glucosa sino de alcohol producido por ella. La consignamos aquí para dar continuidad a la producción de ácidos grasos (butírico, propiónico, acético y fórmico). Pero también puede producirse por reacción de Canizzaro a partir del etanal.

Fermentación fórmica.—El *Bacillus prodigiosus* es el determinante específico de esta fermentación. El hidrato de metilglioxal, como hemos visto antes, puede desdoblarse en etanal y ácido fórmico:

$$CH_3—CO—CH(OH)(OH) \longrightarrow CH_3—COH+H—COOH$$

Fermentaciones sucínica y fumárica.—Ya indicamos en otros lugares cómo pueden formarse estos ácidos en la fase terminal oxidativa (a partir de alcohol o de ácido láctico) de la fermentación de la glucosa; como producto accesorio a partir del ácido glutámico.

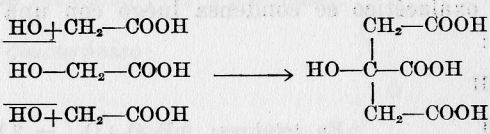
Pero existen hongos específicos que originan estos ácidos. El *Mucor stolonifer* y el *mucedo,* cultivado sobre glucosa en presencia de CO_3Ca y alimentos nitrogenados (o lo mismo sobre ácido acético) da una mezcla de los citados ácidos.—El mecanismo no es

conocido pero puede muy bien admitirse la formación prévia de ácido acético que da sucínico por deshidrogenación y fumárico por más deshidrogenación. El hidrógeno separado se desprende. Seguramente interviene la Fumarasa y la Sucinasa. El *Rhizopus nigricans* y el *Aspergillius fumaricus* producen principalmente ácido fumárico.

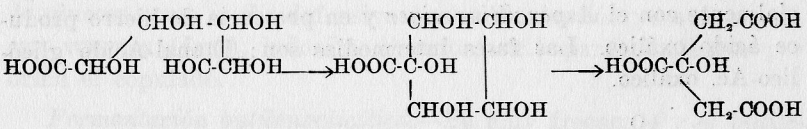
Fermentación Cítrica.—Los *Citromicetos* y el *Sterigmatocystis nigra,* en ausencia absoluta de hierro y en medio azucarado y pobre en azoados, transforma a la glucosa en ácido cítrico. También el *Aspergillus niger,* tan usado en Norte-América, cuya producción por este método pasó de cinco mil toneladas en 1935.

Se desconoce el mecanismo y se han supuesto varios:

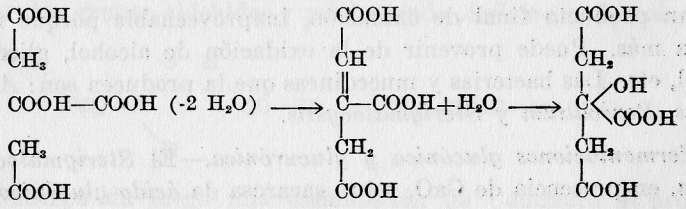
1º Soldadura de *tres* moléculas de *etanal* (Euler), de *ácido pirúvico,* de *metilglioxal* (Neuberg) o de *ácido glicólico* (Schöen); proviene este último de la oxidación del ácido acético. El mecanismo es el siguiente con el ácido glicólico:



2º Paso de glucosa a glucurónico y de éste a cítrico (Butkewitsch):

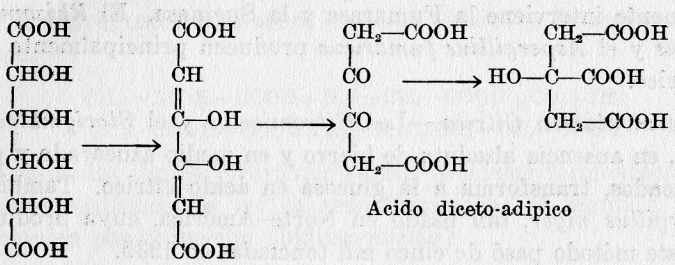


3º Fijación de ácido oxálico sobre ácido acético para dar ácido aconítico y éste por hidratación da ácido cítrico (Ravenna):



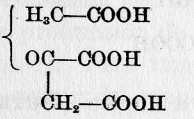
Acido aconítico

4º Los precursores son el ácido glucónico y el sacárico (KNOOP y WINDAUS); que pasan enseguida a ácidos β-γ-dicetoadípico (WALKER y CHALLENGER):



Es la hipótesis más verosímil. El *Sterigmatocystis nigra* privado de alimentos minerales, produce los ácidos glucónico, cítrico y oxálico a expensas de sacarosa.

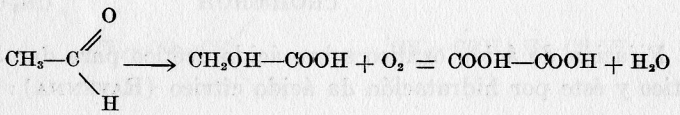
5º Producción previa de ácido oxalacético a partir de acético por deshidrogenaciones y deshidrataciones en la fase final oxidativa; el ácido oxalacético se condensa luego con una molécula de ácido acético:



En total es: $6_6H_{12}O_6+O_2 = 2\,H_2O+C_6H_6O_7$

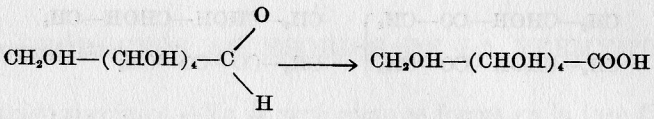
y es genuinamente *aerobia*.

Fermentación oxálica.—La misma fermentación anterior especialmente con el *Aspergillius niger* y en presencia de hierro produce ácido oxálico. Las fases intermedias son: Etanal-Acido glicólico-Ac. oxálico.



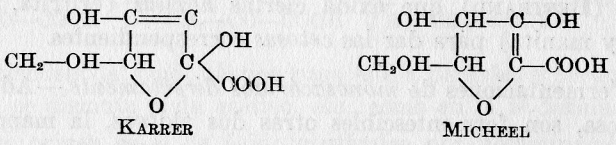
Es un producto final de oxidación, inaprovechable porque no se oxida más. Puede provenir de la oxidación de alcohol, glicerina, glicol, etc. Las bacterias y mucedineas que la producen son: *Aspergillus, Penicillium* y *Sterigmatocystis.*

Fermentaciones glucónica y glucurónica.—El *Sterigmatocystis nigra,* en presencia de CaO, sobre sacarosa da *ácido glucónico.* La acción es debida a una *Glucoxidasa*:



y es un proceso oxidante.

Los *ácidos urónicos* en general son integrantes de gomas y de mucílagos; la formación de estos cuerpos y de las materias pécticas (enfermedad de la goma) es una oxidación a partir de pentosas y hexosas. Uno de estos ácidos es el *ascórbico* o Vitamina C:

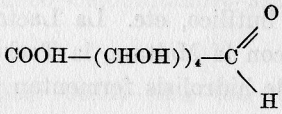


KARRER MICHEEL

Cox

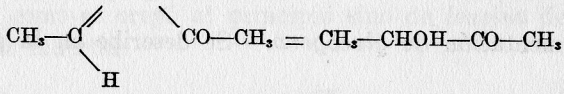
y otras varias fórmulas (ver Vitaminas).

El *ácido glucurónico*:



es el principal y se forma en el organismo humano por oxidación de glucosa como medio defensivo de desintoxicación pues se copula con venenos (fenol, indoxilo, alcanfor, etc.) para eliminarse por orina el copulado.

Fermentación butilenoglicólica.—Es muy frecuente y el *butilenoglicol* se encuentra siempre en la fermentación alcohólica, en la sangre, etc. En su formación interviene una diastasa especial *sintetizante* llamada *carboligasa* que actúa sobre el etanal aldolizándolo por dos grupos aldehidos y produciendo *Aciloina* o *Acetoina*:



Este cuerpo da luego una dismutación de Canizzaro y produce *butileno-glicol* y *diacetilo*:

$$\left.\begin{array}{l} CH_3—CHOH—CO—CH_3 \\ CH_3—CHOH—CO—CH_3 \end{array}\right\} \quad \begin{array}{l} CH_3—CHOH—CHOH—CH_3 \\ CH_3—CO—CO—CH_3 \end{array}$$

El *Bacterium lactis aerogenes* es la Bacteria principal para esta fermentación.

Fermentación de otros Carbohidratos.—Entre ellas citemos como típicas las siguientes:

1º Las producidas por el *Bacterium xilinum* o Bacteria de la sorbosa (BERTRAND) que oxida ciertas *hexitas* (eritrita, arabita, sorbita y manita) para dar las *cetosas* correspondientes.

2º Fermentaciones de *monosacáridos directamente.*—Además de la glucosa, son fermentescibles otras dos aldosas, la manosa y la galactosa; y una cetosa: la fructosa. Todas ellas pueden fermentar como la glucosa.

3º Fermentaciones de *polisacáridos.*—Ya hemos visto cómo la sacarosa se desdobla por la sacarasa de WILLSTAETTER o invertasa; y cómo también puede fermentar directamente para dar acetoina, ácidos propiónico y butílico, etc. La Lactosa se hidroliza con la Lactasa, la Maltosa con la Maltasa, la Trehalosa con la Trehalasa, etc. Los productos de hidrolisis fermentan como la glucosa.

4º Fermentación de *Almidones.*—La diastasa típica o amilasa lo hidroliza a hexosas. Pero también fermentan directamente para dar ácido butírico con los bacilos de este nombre. El *B. macerans* los desdobla en dextrina α y β cristalizadas de SCHARDINGER que no son ya fermentescibles; la α es la diamilosa, la β es la hexamilosa.

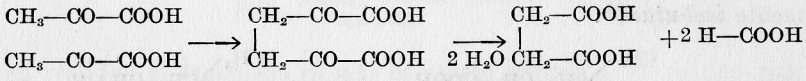
5º Fermentación de *gomas, mucílagos* y *pectinas.*—Se hidrolizan con pectasa, jugo de hepatopáncreas de caracol, idem de ciertos animales marinos, etc. El especial para alginas, procede de estos últimos.

6º Fermentación de *glucógeno.*—Se describe en la glucogenolisis.

7º *Celulosa.*—Se hidroliza por Celulasa. El *Aspergillius niger* da β-glucosa siempre.

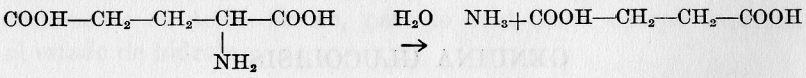
LOS PRODUCTOS ACCESORIOS DE LA FERMENTACION

Acido succínico.—Ya se verá cómo se forma en la fase final oxidativa de fermentación alcohólica a partir del ácido acético. También está probada su formación a partir de ácido pirúvico que forma primero diceto–adípico el cual se hidrata y da sucínico y fórmico (TOENIESSEEM):

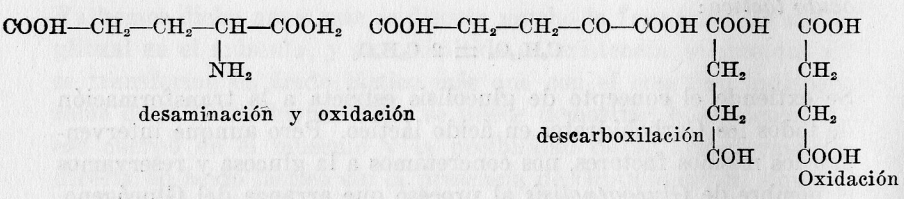


La lacticolisis del ácido láctico pasa éste a pirúvico y luego a etanal el cual se dismuta y da acético, etc., como en la 5ª forma.

Otro origen es el de ácido glutámico por desaminación y descarboxilación:

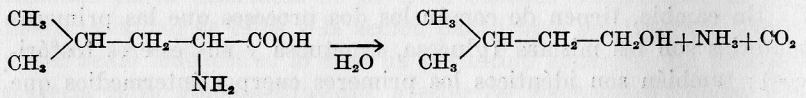


El proceso es: Glutámico–Cetoglutámico–aldehido succínico–Acido succínico:



El glutámico procede de las proteínas de las células muertas de la levadura. El ácido sucínico establece la relación entre Carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos y es interesante para explicar el paso de glúcidos, lípidos y prótidos.

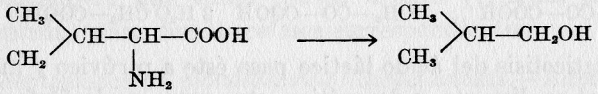
Alcohol Amílico.—Isopentanol.—No procede de pentosas ni de furfurol como se creyó al principio sino de *leucina* de albúminas de células muertas.



Hay desaminación y descarboxilación por las diastasas correspondientes. El proceso en definitiva es una óxidoreducción o hidratación.

Este alcohol acompaña al etanol y da productos de cola que son tóxicos.

Los otros alcoholes intermedios (propílico y butílico) se originan en fermentaciones microbianas especiales que estudiamos en otro lugar. De todos modos la *valina* puede dar también análogamente *isobutanol*:



Todos estos alcoholes reaccionan con los ácidos y se esterifican dando el *bouquet* de los vinos añejos.

GENUINA GLUCOLISIS

Es el proceso anaerobio de la transformación de la glucosa en el músculo y en general en las células animales, con producción de *ácido láctico*:

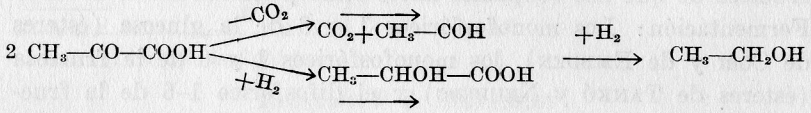
$$C_6H_{12}O_6 = 2\ C_3H_6O_3$$

Se extiende el concepto de glucolisis estricta a la transformación de todos los Carbohidratos en ácido láctico. Pero aunque intervengan los mismos factores, nos concretamos a la glucosa y reservamos el nombre de *Glucogenolisis* al proceso que arranca del Glucógeno.

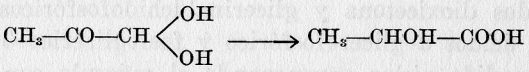
La Glucolisis y la Fermentación se diferencian no solamente en los productos finales del proceso (ácido láctico en la primera y alcohol en la segunda), sino también en muchos de los cuerpos intermedios que se forman y en el sitio en que tiene lugar todo el proceso; éste es exocelular en la fermentación y se lleva a cabo con el jugo que dan las células del substrato y las productoras de Diastasas. La genuina Glucolisis es endocelular y tiene su asiento en el interior de las células.

En cambio, tienen de común los dos procesos que las primeras materias son las mismas (glucosa, fructuosa y sus ésteres fosfóricos); también son idénticos los primeros cuerpos intermedios que

se forman (triosafosfatos, etc.) hasta llegar al término de ácido pirúvico si se acepta la explicación de MEYERHOF, o de metilglioxal si se admite la teoría de NEUBERG. Según la primera, el ácido pirúvico se descarboxila para dar etanal y luego alcohol en la fermentación; y se reduce para producir ácido láctico, en la glucolisis:



en realidad el fenómeno es más complejo porque en el primer caso (como vimos) el ácido pirúvico y el etanal reaccionan con la glucosa y producen también ácido fosfoglicérico para dar, por dismutación, ácido láctico y ácido dioxicetonafosfórico el cual vuelve al ciclo de reacciones. Según NEUBERG, DAKIN, etc., el metilglioxal se transforma por la metilglioxalasa (o Cetoaldehidomutasa) directamente en ácido láctico, para lo cual dicho cuerpo funciona al estado de hidrato:

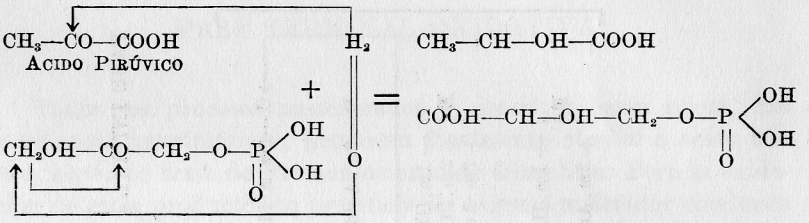


Ya hemos dicho antes que se discute mucho la formación de metilglioxal en el músculo; y aun admitida su existencia, se cree que no se transforma en ácido láctico más que con el concurso indispensable de la Glutathiona. Pero se puede demostrar la existencia de ese cuerpo en el músculo y la posibilidad de su transformación directa en ácido láctico sin la presencia de Glutathiona ni siquiera de Metilglioxalasa. Ahora bien, siempre se origina de ese modo el ácido *levo*–láctico casi con exclusión del *dextro*–láctico que es el único que se forma y existe en el músculo.

En la papilla muscular se ha conseguido aislar dioxicetona, glicerina y aldehido glicérico al estado de sus respectivos ésteres fosfóricos lo cual prueba su formación durante el proceso de glucolisis. Puede también utilizarse todo el razonamiento que empleamos para la fermentación (hasta el término de ácido pirúvico fundado en la existencia de diversos cuerpos intermedios, la fermentescibilidad de éstos y la acción paralizante del fluoruro sódico y del ácido iodoacético lo cual ha permitido aislarlos. La primera materia es la glucosa-6-fosfato, o ester de EMBDEN-ROBINSON, lla-

mado de antiguo *Lactacidógeno* por ser generador de ácido láctico; su paso a difosfato (ester de HARDEN) no está todavía bien dilucidado, pero tiene lugar con el concurso de Hexoquinasa, Fosforilasa y Cofermentos. En realidad se han podido aislar y caracterizar en el jugo muscular los cinco ésteres fosfóricos de glucosa y de fructosa de que nos ocupamos antes como primeras materias de la Fermentación: Los monofosfóricos 1 y 6 de la glucosa (ésteres de CORI y de EMBDEN), los monofosfóricos 1 y 6 de la fructosa (ésteres de TANKÓ y NEUBERG) y el difosfórico 1–6 de la fructosa (ester de HARDEN).

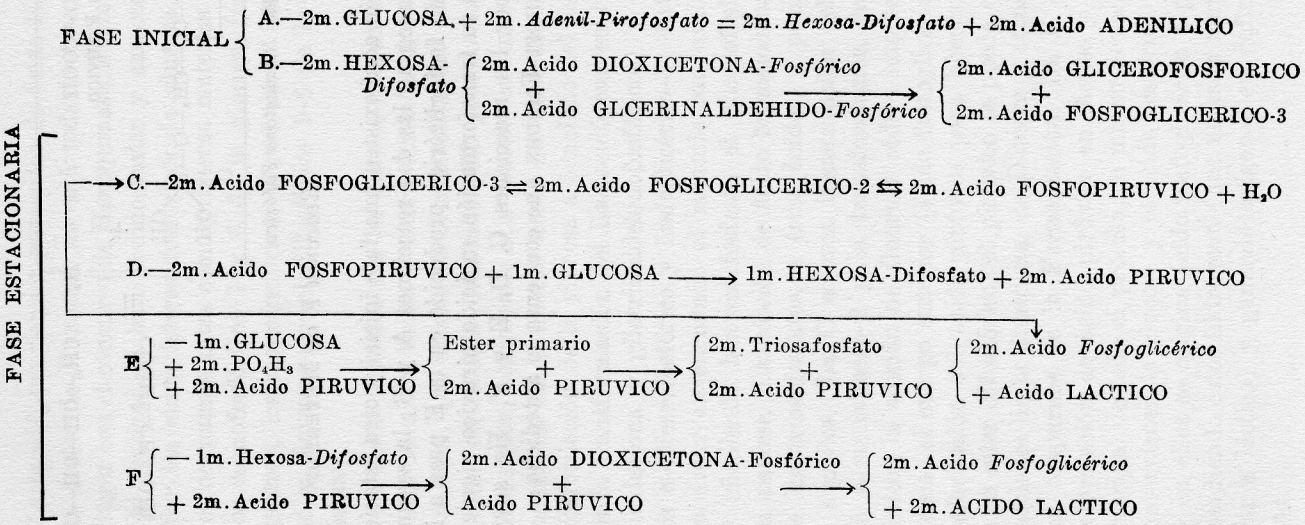
Los donadores del ácido fosfórico son los mismos que en la fermentación; el sistema adenilfosfórico, y ahora también el creatinfosfórico y otros análogos, que existen en el músculo como veremos más adelante al hacer su estudio detallado. El proceso total y completo, según MEYERHOF, comprende seis reacciones fundamentales que se distinguen en las primeras letras del abecedario. La A es una simple fosforilación de la glucosa a beneficio del sistema adenílico. La B es la transformación del Lactacidógeno en triosafosfato (ácidos dioxicetona y glicerinaldehidofosfóricos) y éstos, a su vez, en ácidos α–glicerofosfórico y fosfoglicérico–3. Este último se ha podido aislar envenenando el músculo con oxalato o fluoruro sódico y añadiendo hexosadifosfato; el glicerofosfórico ha podido también aislarse. La adición de ácido bromoiodoacético impide el paso de los triosafosfatos, a éstos ácidos, y posibilita el aislamiento de aquéllos. La C es una isomerización del ácido fosfoglicérico–3 a su isómero–2 y la transformación de éste en ácido fosfopirúvico; la adición de fluoruro sódico impide esta última y permite aislar el cuerpo anterior (ácido fosfoglicérico-2). La D es la desfosforilación del ácido pirúvico para libertarlo y pasar la glucosa a su ester difosfórico; el pirúvico se puede caracterizar por las reacciones de la dimedona, de DÖBNER y otras que ya mencionamos al ocuparnos de la Fermentación. La E es en definitiva la transformación de ácido pirúvico en láctico y es la característica y principal de todo el proceso; lo mismo decimos de la F; en las dos intervienen la glucosa y el ácido fosfórico (o el hexosadifosfato) y en ellas se origina ácido fosfoglicérico a partir de triosafosfatos perdiendo éstos hidrógeno (que necesita tomar el pirúvico para pasar a láctico) y ganando oxígeno; en definitiva es una dismutación:



Acido Dioxicetona-Fofórico

Reacción F de Meyerhof

También aquí existen una fase inicial y otra estacionaria; la primera la integran las dos reacciones A y B; la segunda las restantes. El ácido fosfoglicérico producido en la E pasa a incorporarse a la C para su transformación en ácido pirúvico, siguiendo el ciclo marcado por las reacciones C, D, E y F. He aquí el esquema de Meyerhoff-Embden que condensa lo antedicho:



ESQUEMA DE MEYERHOF-EMBDEN

Acido Láctico

FASE TERMINAL OXIDATIVA

Todos los procesos mencionados y descritos hasta ahora, son totalmente anoxibióticos; producen finalmente *alcohol* o *ácido láctico,* según se trate de Fermentación o de Glucolisis. Pero la oxidación de estos productos en presencia de oxígeno molecular conducen siempre a la formación de *etanal,* cuyo cuerpo se ha demostrado que existe siempre en la levadura de fermentación y en el jugo muscular.

El ácido láctico se deshidrogena para pasar a pirúvico y éste se descarboxila para producir etanal:

$$CH_3—CHOH—COOH + O_2 \rightarrow H_2O + CH_3—CO—COOH \rightarrow H_2O + CO_2 + CH_3—COH$$

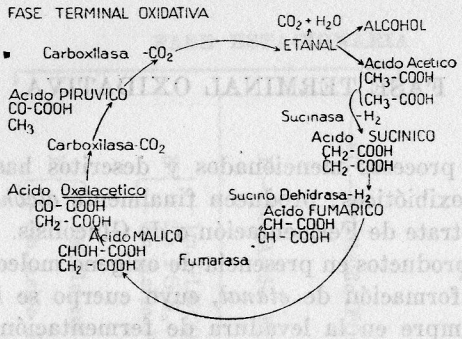
El alcohol se deshidrogena también para transformarse en su aldehido:

$$CH_3—CH_2OH + O_2 \longrightarrow H_2O + CH_2—COH$$

Las dos reacciones son de deshidrogenación pero el aceptor del hidrógeno separado es, siempre, el oxígeno molecular. No se ha podido demostrar a completa satisfacción la existencia de las Dehidrasas que determinan estos procesos finales; no así la de las Carboxilasas existentes, sobre todo, en la piel; ni la de las Codehidrasas I y II también muy difundidas.

El etanal así producido se dismuta fácilmente en alcohol y ácido acético; y este último pasa sucesivamente a ácidos succínico, fumárico, málico, oxalacético y pirúvico; este último vuelve a etanal continuando el ciclo; durante el cual en definitiva, se restituye una molécula de ese aldehido en tanto que otra va perdiendo CO_2 y H_2 (éste va con oxígeno para dar agua y de ahí que la fase tenga que ser forzosamente oxidativa).

La existencia en el tejido muscular de las distintas Dehidrasas e Hidratasas necesarias para todas estas transformaciones, y la puesta en evidencia de los cuerpos antes mencionados, demuestran la exactitud de estas aseveraciones; todas esas diastasas (sucinasa, fumarasa, etc.) han sido consideradas en su lugar correspondiente. He aquí un esquema que resume lo antedicho:



LACTICOLISIS

La suerte que sigue el ácido láctico producido en el músculo puede ser otra distinta de la indicada antes, o transformación en pirúvico y luego en etanal. Alguna parte de él retorna a glucosa por proceso inverso al de su formación estableciéndose un ciclo del cual nos ocuparemos más adelante. Pero otra parte puede descomponerse (Lacticolisis) en cuerpos diversos de los que figuramos en el esquema anterior, y derivados también del etanal. Este último puede endoxidarse y pasar a ácido acético, el cual sigue oxidándose hasta oxálico y, finalmente, se desdobla (siempre por vía oxidativa) en anhídrido carbónico y agua:

$$CH_3—CHO \longrightarrow CH_3—COOH \longrightarrow COOH—COOH \longrightarrow CO_2+H_2O$$

También el metanal puede aldolizarse y el aldol formado se oxida para originar los cuerpos de la triada cetónica, los cuales son como sabemos el ácido β–oxibutírico, el acetilacético y la cetona. Aquí se ve un origen típicamente de carbohidratos, de estos cuerpos, contrariamente a su génesis a partir de grasas que consideramos al ocuparnos de la teoría de la β-oxidación de Knoop en la exposición de las hipótesis explicativas de las óxido-reducciones intraorgánicas:

$$CH_3—C\begin{matrix}O\\H\end{matrix} + CH_3—C\begin{matrix}O\\H\end{matrix} = CH_3—CHOH—CH_2—C\begin{matrix}O\\H\end{matrix} \longrightarrow$$

$$CH_3—CHOH—CH_2—COOH \longrightarrow CH_3CO—CH_2—COOH \longrightarrow CH_3—CO—CH_3$$

También puede el etanal condensarse para formar acetoina (unión de las dos moléculas de aldehido por sus grupos funcionales) con el concurso de la diastasa especial sintetizante llamada *Carboligasa*

por su autor (NEUBERG); la acetoina se dismuta y produce butilenoglicol y diacetilo, como ya vimos al ocuparnos de la Fermentación butileno-glicólica de la glucosa. La existencia de la diastasa sintetizante ha sido muy discutida y negada por diversos autores (DIRSCHERL), los cuales explican la transformación del etanal en aciloina por una simple actividad de una de las moléculas del aldehido; esa actividad puede lograrse sometiéndole a las radiaciones ultravioletas de una cierta longitud de onda (2,700 unidades ANGSTRÖM = 0,0027 milímetros); se transforma rápidamente en aciloina (acetoina) así como también le pasa lo mismo al ácido pirúvico el cual previamente se descarboxila por esas radiaciones para pasar a etanal.

En general, puede decirse que este aldehido etílico, procedente del alcohol o del ácido láctico, es el generador, de muchos cuerpos que se encuentran *in vivo* y que se forman a partir de él por procesos fermentativos, que ya consideramos al tratar de las diversas fermentaciones de la glucosa; estudiadas entonces como producida por microorganismos y estimadas ahora como producidas por diastasas.

GLUCOGENOLISIS

Hasta ahora hemos considerado tan sólo, las transformaciones que experimenta la glucosa (o la fructosa) por vía fermentativa o en el músculo; hemos supuesto que todos los carbohidratos se resuelven en definitiva, en esos azúcares sencillos que existen en la sangre y de ella van a todos los tejidos. Pero también hemos dicho que una buena parte de la glucosa es almacenada en el hígado y en el músculo, al estado de glucógeno; la formación de este polisacárido (Glucogenogenia o Zooamilia) tiene lugar a partir de la glucosa con casi exclusión de otro monosacárido; fructosa o galactosa se transforman antes en glucosa; los disacáridos y las pentosas no intervienen en la síntesis del glucógeno; el ácido pirúvico y el metilglioxal tienen escasa aptitud para la glucogenogenia en tanto que la glicerina, el ácido-*dextro* láctico y la dioxicetona se cambian fuertemente en ese cuerpo. El glucógeno puede también formarse en el hígado a partir de otros cuerpos que no son Carbohidratos; de los ácidos grasos únicamente el propiónico muestra capacidad de formación; y de los amino–

ácidos, principalmente la alanina. En el músculo se sintetiza glucógeno a partir de la glucosa sanguínea por la intervención de la insulina del páncreas. En todos estos procesos intervienen Fermentos diversos.

La cantidad de glucógeno existente en los tejidos (especialmente el muscular) es muy superior (40 gr. por K°) a la que almacena el hígado (2-4%) pero no regula la glucemia más que en un sentido; restando glucosa a la sangre para formar dicho Glucógeno; pero no restituyendo a aquélla (por Glucogenolisis) esa glucosa como hace el hígado. El Glucógeno muscular, además, no tiene otro origen más que la glucosa sanguínea.

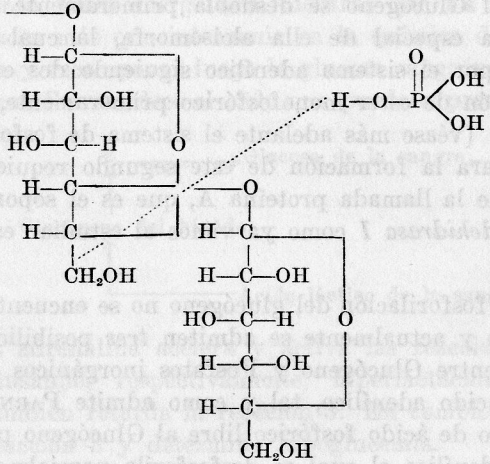
La Glucogenolisis en el hígado tiene lugar a beneficio de la actividad de una diastasa muy difundida en la sangre, la cual ejerce su acción lentamente, a un P_H óptimo = 6,2 en ausencia de cloruros y a P_H = 7-7,4 en su presencia; su actividad aumenta considerablemente por el influjo de la adrenalina y también por las hormonas tiroideas e hipofisiarias. Las fases por las cuales pasa el glucógeno hepático para cambiarse en Glucosa son las siguientes plenamente demostradas:

$$\text{Glucógeno} \xrightarrow[\text{Dextrinasa}]{} \text{Dextrina} \xrightarrow[\text{Amilasa}]{} \text{Maltosa} \xrightarrow[\text{Maltasa}]{} \text{Glucosa}$$

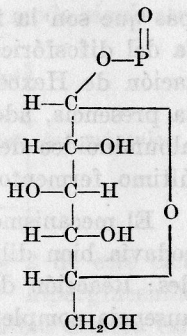
La Glucosa después se fosforila y sigue el proceso de transformación que ya explicamos detalladamente en la Fermentación alcohólica. La Glucogenolisis en el músculo tiene otro proceso distinto. Durante la actividad muscular, el Glucógeno se consume y va siendo suplido por el que va del hígado a la sangre (al estado glucosa) y de ésta al músculo donde se sintetiza para dar Glucógeno. Quiere decirse con esto que lo que se gasta en el tejido muscular es Glucógeno y no Glucosa. Pero ese glucógeno comienza primeramente por hidrolizarse y transformarse en diversos productos intermedios hasta resolverse en glucosa la cual se fosforila en seguida. Como en el músculo no se encuentran diastasas glucogenolíticas (Amilasa, Maltasa, etc.), admiten muchos investigadores que esa transformación es determinada por los fosfatos inorgánicos del jugo muscular; su ácido fosfórico hidroliza a la molécula del Glucógeno y subsecuentemente fosforila a la Glucosa resultante; este proceso es llamado por Parnas "Fosforolisis" del glucógeno y puede expresarse por la reacción siguiente:

Glucógeno + Fosfato inorgánico = Hexosamonofosfato

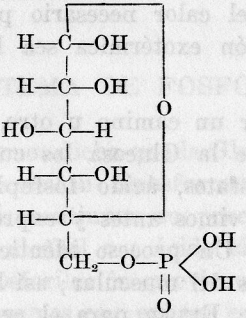
y no intervienen en él ni el sistema adenílico ni el creatínico que son los donadores generales del ácido fosfórico en el músculo; dichos sistemas no son estables en los autolizados musculares y sirven solamente para fosforilar al hexosamonofofato y transformarlo en difosfato. Según PARNAS y CORI, el proceso de transformación puede expresarse por el siguiente esquema (recuérdese la fórmula de constitución del Glucógeno, dada anteriormente, análoga o idéntica a la del almidón); el ester de CORI se transforma rápidamente en el de EMBDEN-ROBISON (Lactacidógeno) el cual pasa parcialmente y queda luego en equilibrio, con el de NEUBERG; todos ellos son monofosfóricos.



Unidad de GLUCÓGENO



Ester de CORI
Glucosa-1-
Fosfato



Ester de EMBDEN-ROBISON
Glucosa-6-Fosfato

ESQUEMA DE PARNAS-CORI

(La formación de ester CORI parece necesitar el concurso del sistema adenílico de fosforilación). Este sistema es absolutamente indispensable para pasar a los ésteres difosfóricos de la glucosa, especialmente al ester de HARDEN-YOUNG:

2 Hexosafosfato + Acido adenil pirofosfórico = 2 Hexosadifosfato + Acido adenílico.

Dichos ésteres difosfóricos no se encuentran en los tejidos animales y se consideran como estabilizadores y también como catalizadores de la Fermentación.

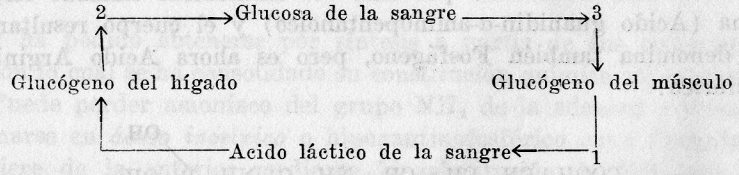
Según MEYERHOF el Glucógeno se desdobla primeramente en Glucosa, en una forma especial de ella aloisomorfa, la cual se fosforila directamente por el sistema adenílico siguiendo dos etapas que son la formación de ester monofosfórico primeramente, y la del difosfórico luego (véase más adelante el sistema de fosforilación de Hexosas); para la formación de este segundo requiere la presencia, además, de la llamada proteína A, que es el soporte albuminoideo de la *Codehidrasa I* como ya vimos al estudiar este último fermento.

El mecanismo de la fosforilación del glucógeno no se encuentra todavía bien dilucidado y actualmente se admiten *tres* posibilidades: Reacción directa entre Glucógeno y Fosfatos inorgánicos en ausencia completa de ácido adenílico, tal y como admite PARNAS y niega LOHMANN; paso de ácido fosfórico libre al Glucógeno por intermedio del ácido adenílico el cual se desfosforila parcialmente; y Proceso desconocido por reacciones acopladas en virtud de las cuales se produce el calor necesario para la Fosforilación; posiblemente esa reacción exotérmica sea la del ácido pirúvico con el Triosafosfato.

De todos modos, por un camino u otro, se llega a la formación de estos ésteres de la Glucosa los cuales, después, se van cambiando en Triosafosfatos, ácido fosfopirúvico y, finalmente en ácido láctico, según vimos antes y expresamos en el esquema de MEYERHOF-EMBDEN. Un proceso idéntico sigue el Glucógeno de otros tejidos distintos del muscular; así lo ha probado nuestro OCHOA para el corazón; EULER para el cerebro y JOST para el riñón. Es de notar que solamente los ésteres fosfóricos de Hexosas, formados de este modo, son los únicos capaces de transfor-

marse; los obtenidos por síntesis *in vitro* no son fermentescibles ni transformables (CAHN y HOUGET). También debe señalarse que esta transformación del Glucógeno tiene solamente lugar en el músculo estriado; el liso, los tumores, la materia gris, la retina, etc. degradan fácilmente a la Glucosa pero no al Glucógeno, quizá porque carecen de ácido adenilfosfórico.

Pero no todo el glucógeno muscular pasa a ácido láctico. Según HILL y MEYERHOF, por cada *cinco* moléculas de glucosa de origen glucogenolítico solamente *cuatro* se transforman en ácido láctico en tanto que la quinta es destinada a la Fermentación para ser en definitiva quemada con producción de calor; cumple, por tanto, fines energéticos mientras que las cuatro antes citadas no hacen más que intervenir en la química de la contracción muscular y recomponer luego la glucosa sanguínea y el Glucógeno hepático. Se establece el ciclo que puede exprsarse del modo siguiente:



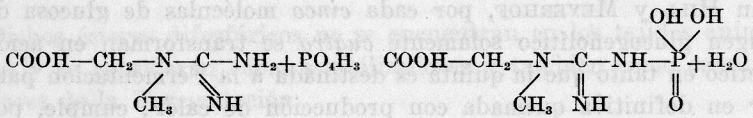
la adrenalina acelera y activa las reacciones 1 y 2 de este ciclo causando, respectivamente, hiperlactacidemia y hiperglucemia; también retarda la reacción 3. En cambio la insulina acelera esta reacción 3 y determina hipoglucemia.

Al ocuparnos más adelante de la química del músculo volveremos sobre estas cuestiones.

EL SISTEMA DE FOSFORILACION

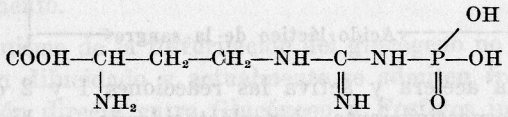
Repetidas veces hemos dicho que la Glucosa (o la Fructosa) y el propio Glucógeno, necesitan transformarse en ésteres fosfóricos diversos para después continuar su proceso de desdoblamiento y llegar, finalmente, a alcohol o a ácido láctico. El ácido fosfórico necesario para esa fosforilación proviene principalmente de compuestos fosforados diversos que existen en los tejidos; la donación o cesión de su ácido fosfórico al carbohidrato es acción reversible puesto que le recuperan después.

De estos compuestos fosforados el que se conoce desde más antiguo es el llamado *Fosfágeno* descubierto por EGGLETON y estudiado primeramente por FISKE y SUBBAROW (1927); este fosfágeno (engendrador o liberador de ácido fosfórico) es un derivado resultante de substituir un átomo de hidrógeno del grupo amínico NH_2 de la creatina por un radical del ácido orthofosfórico:



Creatina. Fosfágeno.

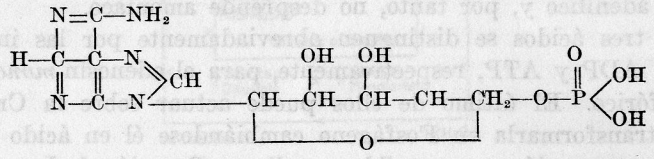
es, por lo tanto, el ácido creatin-fosfórico o Creatinafosfato. Existe en el músculo de todos los vertebrados pero en el de los invertebrados hay un compuesto parecido en el cual la molécula de creatina está substituída por una del aminoácido llamado Arginina (Acido guanidin-α-aminopentanoico) y el cuerpo resultante se denomina también Fosfágeno, pero es ahora Acido Argininfosfórico:



de constitución análoga a la anterior puesto que ambos son derivados de la guanidina (LOHMANN). La descomposición o desfosforilación de estos *Fosfágenos* produce una gran cantidad de calor o energía que es la necesaria para la contracción del músculo, como veremos más adelante. El metabolismo de los Carbohidratos y el de los Fosfágenos de la célula muscular eran tenidos como procesos energéticos acoplados; el primero proporciona la energía necesaria para la formación de los fosfágenos; y éstos al hidrolizarse dan la que necesita el músculo para contraerse.

Actualmente se admite que el sistema fosfágeno constituye una reserva fosfórica la cual no actúa directamente como donador de ácido fosfórico a los Carbohidratos, sino que lo hace sobre cuerpos del sistema adenílico los cuales se fosforilan a beneficio de los Fosfágenos y ceden luego su ácido fosfórico a la Glucosa o al Glucógeno. Esta última función la ejercen con carácter exclusivo y, por tanto, no es compartida con los Fosfágenos.

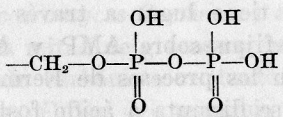
El estudio acabado del otro sistema de fosforilación denominado *sistema adenílico* se debe principalmente a LOHMANN y a PARNAS. Está constituído por los ésteres mono, di y trifosfóricos de la Adenina (unida a una pentosa, la ribosa). El llamado *ácido adenílico* o Adenosinmonofosfórico es un verdadero nucleótido formado por una molécula de Adenina, otra de ribosa y otra de ácido orthofosfórico; corresponde su estructura molecular a la siguiente fórmula de constitución:



Acido Adenosin-**monofosfórico** = ACIDO ADENILICO.

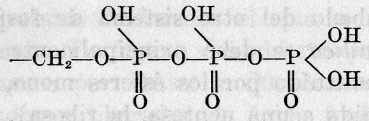
y ha podido obtenerse por síntesis a partir de sus componentes con lo cual se ha consolidado su constitución química así expresada. Puede perder amoníaco del grupo NH_2 de la adenina y transformarse en *ácido inosínico* o hipoxantinofosfórico cuya fórmula difiere de la anterior mediante la substitución de NH_2 por OH (cambio de núcleo de adenina en el de la hipoxantina); en la contracción muscular tiene lugar siempre desprendimiento de amoníaco. PARNAS ha demostrado que este ácido inosínico es tan eficaz como el adenílico para activar la esterificación del Glucógeno con ácido fosfórico libre.

El *Acido adenosindifosfórico* resulta de la fijación de una nueva molécula de ácido fosfórico sobre el anterior; el final de su fórmula será entonces:



que es grupo de ácido pirofosfórico realmente.

El *Acido adenosintriofosfórico* o *Adenilpirofosfórico,* tiene tres restos de dicho ácido en su molécula; el final de su fórmula de constitución será el siguiente:



y se denomina *ácido adenilpirofosfórico* porque puede considerarse derivado del ácido adenílico introduciendo en él un resto de ácido pirofosfórico. Este ácido es el eje central de toda la Glucogenolisis porque es el principal donador de ácido fosfórico al carbohidrato pasando él a ácido adenílico; no es capaz de desaminarse como el ácido adenílico y, por tanto, no desprende amoníaco.

Estos tres ácidos se distinguen abreviadamente por las iniciales AMP, ADP y ATP, respectivamente, para el adenosin-*mono, di* y *tri*fosfórico. El último de ellos puede actuar sobre la Creatina para transformarla en Fosfágeno cambiándose él en ácido adenílico; esta reacción es reversible y se llama *Reacción* de LOHMANN:

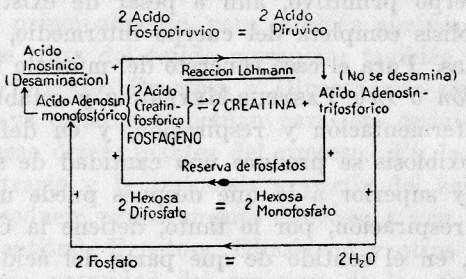
Acido adenosintriofosfórico + 2 Creatina ⇆ Acido adenílico + 2 Fosfágeno

y es favorecida por una Diastasa especial llamada, como vimos, *Pirofasfatasa* actuando como catalizador los iones magnesio.

Los tres ácidos constitutivos del *"Sistema Adenílico"* pueden ceder su ácido fosfórico al Glucógeno, a la Glucosa (o Fructosa) o al ácido pirúvico; se precisa el concurso de las *Fosfatasas* o *Fosforilasas,* (que estudiamos ya en su lugar correspondiente) el de los iones magnesio probablemente también, y el de las Codehidrasas I y II. El paso del ácido AMP y del ADP al ATP no está probado en el músculo pero tiene lugar en la levadura y también, claro es, puede llevarse a cabo en los laboratorios por los métodos generales de fosforilar. El aprovechamiento de fosfatos inorgánicos para la Fosforilación de los Carbohidratos, como suponen PARNAS y CORI, tiene lugar a través del sistema adenílico porque esas sales se fijan sobre AMP y ADP para pasarlos a ATP, precisamente en los procesos de Fermentación y cuando el Gliceraldehidofosfato se dismuta a ácido fosfoglicérico; pero también puede producirse en la fase oxidativa u oxibiótica de combustión de Carbohidratos (RUNNSTRÖM y otros). También LIPMANN demuestra que la Vitamina B determina la reacción entre fosfato inorgánico y Acido adenílico en presencia de pirúvico; y la conversión de éste en ácido acético a través del Fosfato de Vita-

mina B o Cocarboxilasa; esta última reacción suple la energía necesaria para fosforilar el ácido adenílico y pasarlo a adenosintrifosfórico.

He aquí un esquema



Sistema adenilico de Fosforación

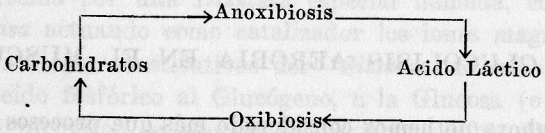
en el cual se puede apreciar el mecanismo de la Fosforilación, tal y como la hemos expuesto antes.

LA GLUCOLISIS AEROBIA EN EL MUSCULO

Hasta ahora no hemos considerado más que procesos anoxibióticos en la fermentación y el músculo. Salvo la fase final oxidativa que expresa la suerte que ha de correr el etanal producido en los procesos mencionados. Pero la propia Glucolisis puede tener una fase oxibiótica o aerobia que vamos a considerar ahora.

Pasteur había demostrado que en la fermentación alcohólica una parte de la Glucosa se oxidaba a beneficio de la otra parte la cual se reducía; en realidad el microorganismo productor de la Fermentación (el *Saccaromyces Cerevisiæ*) cuando vive en contacto del aire consume la mitad de glucosa presente, transformándola en alcohol y anhídrido carbónico, en tanto que la otra mitad se emplea en nutrir las células del microbio produciendo substancias constructivas diversas. También en el organismo humano, la mitad aproximadamente de la glucosa de la sangre es oxidada o quemada en tanto que la otra mitad va a formar Glucógeno (en el hígado, en el músculo y en otros tejidos) o a transformarse en grasas. Pero en donde se ha estudiado, de modo acabado por Me-

YERHOF, este proceso ha sido en el músculo que respira en contacto de oxígeno atmosférico; entonces parte del ácido acumulado se destruye (paso a etanal) pero otra parte se utiliza para la síntesis del glucógeno; esta segunda fracción la indicamos ya al final del capítulo de Glucogenolisis. Este proceso regresivo, de retorno al cuerpo primitivo, aun a pesar de existir condiciones para la desmolisis completa del cuerpo intermedio, es general en todas las células. Para el caso concreto del músculo recibe el nombre de *Reacción o Ley* PASTEUR-MEYERHOF y establece la dependencia entre fermentación y respiración, y en definitiva indica que en la anoxibiosis se produce una cantidad de substancias de desmolisis muy superior a la que después puede utilizar la respiración. La respiración, por lo tanto, detiene la Glucolisis y la Glucogenolisis, en el sentido de que parte del ácido láctico producido pasa nuevamente a formar glucosa y no es oxidado (Lacticolisis) hasta el final. Se establece un ciclo, denominado *Ciclo* MEYERHOF, que puede expresarse, en su forma más sencilla, de este modo:



La reacción en el sentido analítico o de izquierda a derecha es anoxibiótica o exotérmica; la contraria o sintética (de derecha a izquierda) puede ser también anoxibiótica pero es endotérmica y para producirse necesita utilizar el calor desprendido en otra reacción acoplada con ella; esta reacción es la de ulterior transformación o combustión de parte del ácido láctico, la cual es oxibiótica y, por tanto, precisa el concurso del oxígeno. Cuanto más fuerte es la respiración (esta fase última) tanto menor es la cantidad de ácido láctico que se encuentra en el tejido. Se llama *cociente de oxidación* o de MEYERHOF, la relación entre el ácido láctico que desaparece y el que es oxidado:

$$\text{C.O=Cociente de oxidación} = \frac{\text{Acido láctico desaparecido}}{\text{Acido láctico oxidado}}$$

estando calculados el numerador y el denominador en moléculas

de glucosa equivalentes; su valor normal oscila de 3 a 6; en el músculo de rana fatigado pero en reposo y en presencia de oxígeno, el cociente vale 5; en el corazón de embrión de pollo vale 4 y en el músculo de buey oscila entre 3,2 y 11,8. El valor normal quiere expresar que solamente 1/3 a 1/6 del ácido láctico formado se oxida, retornando el resto a Carbohidrato; éste puede ser Glucógeno principalmente, pero también almidón y otros polisacáridos, si se trata del tejido muscular; también y en segunda línea, pueden formarse Fructosa y Glucosa; los sistemas de fosforilación que ya estudiamos actúan para esta resintesis como verdaderas diastasas determinantes del proceso. En los otros tejidos sucede al contrario y la resintesis a partir del ácido láctico va orientada a producir primeramente Glucosa, y con mucha mayor dificultad y lentitud, Fructosa, Glucógeno y otros polisacáridos; posiblemente sin necesidad del concurso de los sistemas de fosforilación.

LA CELULA CANCEROSA

En las neoplasias la célula elabora cantidades muy considerables de ácido láctico y funciona como una levadura anoxibiótica facultativa; de 13 moléculas de glucosa que recibe, 12 se cambian en ácido láctico y solamente *una* se quema u oxida hasta el final. Predomina, por tanto, en ella el proceso analítico de desdoblamiento de glucosa en dicho ácido, incluso hasta en presencia de oxígeno que es capaz de llevar a cabo la lacticolisis en la célula normal. Por eso WARBURG denomina a este proceso predominante en la célula cancerosa, *Glucolisis aerobia*, con cuya expresión se quiere significar el predominio enorme de la simple glucolisis aun en presencia de oxígeno. Este cuerpo es consumido, por tanto, en los tumores malignos (carcinoma y sarcoma) en mucha menor proporción que en los tejidos normales; y aun dentro de las propias células del cáncer consumen menos oxígeno aquellas que se reproducen con lentitud, en tanto que los de proliferación rápida gastan más. Este predominio de las escisiones sobre las oxidaciones, esta impotencia de la respiración para corregir la glucolisis en su fase final, hace que el consumo de glucosa en estas células sea enorme porque la simple glucolisis

que efectúan es la única reacción de la cual ha de tomar la energía necesaria para todas sus funciones, especialmente la de reproducción que es tan intensa en las neoplasias. Y como la escisión de la molécula de glucosa en dos de ácido láctico desprende muy poco calor, es necesario que se supla este efecto con el aporte de grandes cantidades de glucosa. Este régimen de prodigalidad en que viven dichas células determina una repercusión en la Glucemia porque el gasto enorme que se hace de glucosa hace bajar el índice glucémico; y por esto la administración de insulina mitiga el desarrollo de las neoplasias en tanto que lo aumenta el aporte de glucosa por vía parenteral.

No es solamente la célula cancerosa la que muestra este especial metabolismo de los carbohidratos. Se ha podido demostrar también en diversos tejidos normales, como son los embrionarios y los de crecimiento rápido; tal sucede, por ejemplo, en el feto. Pero también sucede lo mismo en la retina, en la cual no hay procesos proliferativos intensos y en cambio manifiesta una glucolisis muy fuerte sin duda porque el tejido retiniano pierde fácilmente su capacidad para la oxidación y respiración y en cambio conserva la función glucolítica.

LA CONTRACCION MUSCULAR EN SU ASPECTO BIOQUIMICO

La contracción del músculo puede tener lugar en medio anoxibiótico y en ambiente oxibiótico. La primera es la principal y casi exclusiva, con lo cual se prueba que la respiración en el tejido muscular es un proceso independiente, aunque muchas veces simultáneo y paralelo al de la contracción. El proceso de la respiración no suministra, por lo tanto, la energía necesaria para que tenga lugar la contracción del músculo.

Durante mucho tiempo se creyó que la contracción muscular era debida a la producción de ácido láctico derivado de la Glucosa por desdoblamientos ya conocidos; y que esta formación de ácido láctico era la determinante de la contracción dicha en su doble aspecto energético y plástico. Todo ello en medio anaerobio o anoxibiótico. Discriminemos este supuesto. Efectivamente se observa la aparición de una gran cantidad de ácido láctico

cuando el músculo trabaja durante mucho tiempo y, por tanto, se contrae de modo exagerado; tan elevada es entonces esa cantidad que puede entonces dicho ácido llegar a coagular los albuminoides musculares; la rigidez cadavérica puede explicarse por esta causa. Cierto, también, que el ácido láctico se forma siempre en el tejido muscular y es bien fácil caracterizar su presencia en él. Igualmente exacto que puede proceder de la glucosa por transformaciones diversas que ya estudiamos, todas ellas anoxibióticas. Pero hemos probado anteriormente que esa procedencia tiene lugar en diversos tejidos *con exclusión* del muscular; en éste el ácido láctico no proviene de la Glucosa sino del Glucógeno (véase antes Glucogenolisis), el cual puede transitoriamente desdoblarse en glucosa y ésta se fosforila enseguida originando ésteres fosfóricos muy parecidos, pero no idénticos, a los que se producen en la fermentación de la tantas veces citada Glucosa. Además, la energía producida en la formación de ácido láctico a partir de glucógeno, no es la que utiliza el músculo para contraerse; por lo menos no es la principal fuente de ella. La Glucogenolisis con formación de ácido láctico es un proceso secundario que tiene lugar simultáneamente con el de la contracción muscular. Pero ésta puede llevarse a cabo sin aquél y sin glucógeno; si se intoxica el músculo con ácido iodoacético (LUNDSGAARD), sigue contrayéndose en ausencia de ácido láctico que ya no puede producirse, pues el veneno dicho impide la ulterior transformación de los triosafosfatos que se producen al desdoblarse los ésteres fosfóricos de la glucosa y el proceso lacticogenético se detiene, como ya vimos al explicar el esquema de MEYERHOF-EMBDEN anteriormente. También se ha probado la contracción muscular en animales de experiencia, a los cuales se les ha privado de casi todo el glucógeno y la glucosa de su tejido muscular mediante inyecciones masivas de insulina (OCHOA).

Se ha observadó primeramente que la hidrolisis del Fosfágeno (Acido creatinfosfórico o análogo) acompaña siempre a la contracción muscular y que esa hidrolisis se produce con gran desprendimiento de calor que puede ser la fuente de energía necesaria para dicha contracción; pero la resíntesis del Fosfágeno cuya cantidad permanece constante normalmente en el músculo necesita consumo de energía y ésta ha de venir de otro origen que es la escisión del adenil–pirofosfato en ácido adenílico y

ácido pirofosfórico. Esta reacción (I del esquema siguiente) desprende 24.000 calorías pequeñas por molécula gramo de cuerpo hidrolizado o sean 170 calorías por gramo de ácido fosfórico liberado; la misma cantidad es producida si dos moléculas del ácido adenilpirofosfórico (o adenosintrifosfórico) actúan sobre el glucógeno para originar ácido adenílico (2 mol) y ester difosfórico (2 mol) (reacción II del esquema). La existencia de ácido fosfórico libre durante la contracción lo explica la reacción I, así como la disminución de volumen del músculo. La resíntesis del ácido adenilpirofosfórico se hace a beneficio del fosfágeno, el cual actúa con el ácido adenílico producido en las reacciones I y II y libera creatina (reacción III); la energía necesaria para esta reacción es tomada de parte de la desprendida en las anteriores. La creatina se une más tarde cuando el músculo está en reposo, con el adenilpirofosfato para regenerar al Fosfágeno, en reacción reversible de la anterior (es la VII del *segundo* esquema). Las reacciones siguientes (IV a VII) son ya conocidas por nosotros porque expresan las transformaciones que va sufriendo el hexosadifosfato hasta producir ácido fosfopirúvico, y las consignamos en el esquema de MEYERHOF-EMBDEN de producción de ácido láctico; lo mismo decimos de la VIII en la que se expresa la defosforilación del ácido fosfopirúvico para regenerar el adenilfosfato, el cual nuevamente actúa sobre el Glucógeno (reacción I igual a la II); y las X, XI y XII que explican la form de ácido láctico. Cuando cesa la contracción muscular existe un sobrante de ácido glicerofosfórico (reacción V) y de ácido pirúvico (excedente de la reacción XII que pasa a la VII) en proporciones equimoleculares; reaccionan entre sí y producen la reacción XIII con liberación de ácido láctico, originado como se ve en la fase de reposo del músculo; pero MEYERHOF y KIESSLING han probado que esta reacción es mucho más lenta que la XI, es decir, que el ácido láctico se produce mucho más rápidamente durante la contracción del músculo que en el período de descanso de éste.

En resumen, la verdadera reacción eficiente para la contracción muscular es la hidrolisis del Fosfágeno precedida de la del ácido adenilpirofosfórico que es la primera fuente de energía; la intervención de los Glúcidos (Glucosa o Glucógeno) es la de reconstruir dichos compuestos fosforados a beneficio de los suce-

sivos desdoblamientos que van experimentando dichos carbohidratos y en los cuales (especialmente al producir ácido láctico) se desprende gran cantidad de calor. Todo el conjunto constituye un sistema de reacciones acopladas y, por tanto, difíciles de discernir; principalmente son la hidrolisis del Fosfágeno acoplada con la resíntesis del ácido adenilpirofosfórico; y la transformación del Glucógeno en ácido láctico acoplada con la resíntesis del Fosfágeno (músculo en reposo).

Cuando el músculo descansa la serie de reacciones que se producen (siempre anaerobias) se condensan en el segundo esquema consignado más adelante. Todas conocidas ya porque nos ocupamos de ellas al tratar de los sistemas de fosforilación; únicamente debemos resaltar la VII que expresa la reconstrucción del Fosfágeno a partir del ácido adenilpirofosfórico, como ya anticipamos; es la *reacción de* LOHMANN en su forma reversible.

He aquí los esquemas a los cuales nos hemos referido tantas veces.

FASE DE CONTRACCION EN EL MUSCULO

I.—Adenilpirofosfato → Acido adenílico + 2 PO_4H_3 (+24.000 calorías)

II.—2 „ „ + GLUCÓGENO → 2 „ „ +2 Hexosadifosfato (+24.000 cal)

III.—2 Creatinofosfato + Acido adenílico → Adenilpirofosfato + 2 Creatina (—1.000 cal.)

IV.—2 Hexosadifosfato ⇌ 2 Dioxicetonafosfato + 2 Gliceraldehidofosfato (—28.000 cal → +28.000 cal ←).

V.—4 Triosafosfato → 2 Acidofosfoglicérico—3 + 2 *Ac. Glicerofosfórico* (+28.000 cal).

VI.—2 Acido fosfoglicérico—3 ⇌ 2 Acido fosfoglicérico—2 (+O calorías).

VII.—2 Acido fosfoglicérico—2 ⇌ 2 Acido fosfopirúvico | (+O| calorías).

VIII.—2 Acido fosfopirúvico + Acido adenílico → 2 *Acido pirúvico* + Adenil fosfato (—7.400 calorías)

IX.—Adenilpirofosfórico + GLUCÓGENO = II.
X.—Hexosadifosfato = IV = 2 Triosafosfato.

XI.—2 Triosafosfato + 2 Acido pirúvico → 2 Acido fosfoglicérico + 2 ACIDO LÁCTICO (+16.000 cal)

XII.—2 Acido fosfoglicérico → = VII.

XIII.—2 Ac. Glicerofosfórico + 2 Ac. pirúvico → 2 Triosafosfato + 2 ACIDO LÁCTICO (+16.000 cal.)

FASE DE REPOSO EN EL MUSCULO

I.—GLUCÓGENO+PO_4H_3→2 Hexosamonofosfato(+O calorías).

II.—2 Hexosamonofosfato+Adenilpirofosfato→2 Hexosadifosfato+Acido adenílico (+24.000 cal).

III.—Como IV anterior.

IV.—4 Triosafosfato+4 Acido pirúvico→4 Acido fosfoglicérico+ACIDO LÁCTICO (+32.000 cal.)

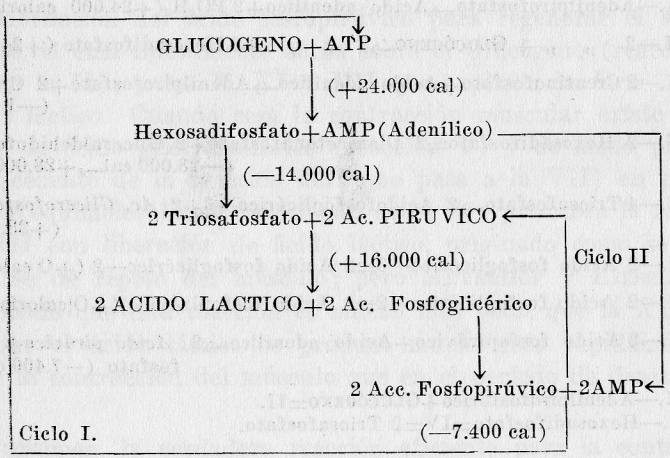
V.—Como VII anterior.

VI.—Como VIII anterior.

VII.—Adenilpirofosfato+2 Creatina→2 Creatinofosfato+Acido adenilico (+1.000|cal.)

VIII.—Como VIII anterior.

En forma más simplificada y gráfica, ha establecido NEEDHAM este otro, en el cual se aprecian claramente los diversos ciclos de reacciones que tienen lugar. El I es la reacción VIII del esquema anterior (fase de contracción) que expresa la resíntesis del ácido adenilpirofosfórico a partir del fosfopirúvico y el adenílico. El II es la reacción VII que es reversible en combinación con la XI.



ESQUEMA DE NEEDHAM

La contracción y la recuperación musculares pueden también tener lugar en medio aerobio o oxibiótico. Entonces las primeras materias pueden ser distintas o por lo menos transformadas

y consumidas de modo distinto al que lo hacen en medio anaerobio. Los ésteres fosfóricos de la Glucosa pueden retroceder a Glucógeno durante el período de reposo del músculo, sobre todo cuando éste fué excitado anteriormente con adrenalina o envenenado con ácido iodoacético (Cori y otros). La resíntesis del Fosfágeno tiene lugar también en medio aerobio y durante la contracción muscular, a expensas de la oxidación de varias substancias (piruvatos, succinatos, etc.), incluso las grasas, sin que se acompañe de producción simultánea de ácido láctico (Grimlud). También Millikan ha probado que una importante fuente de energía para el proceso de contracción muscular es el desdoblamiento de la Oxihemoglobina del músculo con liberación de su oxígeno y formación de Hemoglobina reducida. La utilización de los lípidos y prótidos en este proceso que consideramos no ha podido establecerse por análisis directo de los tejidos pero nuestro Ochoa ha demostrado que músculos casi totalmente privados de Carbohidratos pueden rendir un considerable trabajo, mucho más intenso que el que dan con los citados Glúcidos y sin que la hidrolisis de los ácidos creatino y adenosinfosfóricos pueda aportar la energía necesaria. Durante la contracción muscular aumenta la intensidad de los cambios respiratorios y ésta dura largo tiempo después del reposo, constituyendo lo que los ingleses denominan *"Deuda de oxígeno"*; estudiando el valor del cociente respiratorio han podido deducir algunos autores que en un trabajo prolongado la combustión del Glucógeno suministra solamente el 1/17avo de la energía liberada siendo el resto suplido por la combustión de grasas seguramente transformándose primero en Hidratos de Carbono.

Por otra parte se ha demostrado en animales de experiencia, sostenidos en equilibrio nitrogenado, que el nitrógeno urinario aumenta durante el trabajo muscular, lo cual hace suponer también un aporte y consumo de Albuminoides, bien directo o bien con previa transformación en Hidratos de Carbono.

No es necesario hacer constar que las interpretaciones que hemos expuesto no satisfacen completamente y definitivamente a nuestro espíritu; ni tan siquiera a los hechos de observación y de experiencia, tanto *in vivo* como *in vitro*. Las investigaciones sobre la Bioquímica del músculo son de extraordinaria dificultad, pues los fenómenos tienen lugar en décimas de segundo, las subs-

tancias formadas transitoriamente se cuentan por miligramos y su aislamiento ha podido hacerse gracias al empleo de venenos diversos que detiene el proceso en estadios determinados; además, las experiencias se han llevado a cabo, primeramente sobre zumo o jugo muscular, después sobre músculos aislados de animales piokolotermos (la rana principalmente) que se pueden mantener sobrevivientes durante mucho tiempo sin que la sangre les aporte materiales de reserva; observaciones y experiencias sobre músculos de animales homeotermos nos faltan todavía y aunque las hubiera, siempre habría de discernirse sobre la variación de composición química, constante, de un músculo cualquiera y, distinta (dentro de ciertos límites), del que esté próximo a él en el mismo tejido.

El problema llama actualmente y de modo poderoso la atención de los investigadores de todo el mundo. El movimiento, propiedad característica de la vida animal, se vincula a la actividad del músculo, especialmente al de la fibra estriada; la producción de energía y de trabajo es también función del músculo. El simple enunciado de estos postulados evidencia su importancia. El estudio de los mecanismos bioquímicos que tienen lugar, es del más elevado interés científico y práctico.

BIBLIOGRAFIA

LIBROS Y REVISTAS DE CARACTER GENERAL

G. KLEIN. — Handbuch der Pflanzen Analyse. — Tomo IV/2. — Págs. 839 a 907. — Año 1933.

C. OPPENHEIMER. — Die Fermente und ihre Wirkungen. — 1929.

H. v. EULER. — Chemie der Enzyme. — 1920 - 1932.

E. ABDERHALDEN. — Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. — 1911.

E. ABDERHALDEN. — Biochemisches Handlexikon. — Tomo V. — 1911.

C. OPPENHEIMER. — Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere. — 1925 - 1934.

C. OPPENHEIMER y R. KUHN. — Lehrbuch der Enzyme. — 1927.

C. WEHMER. — Pflanzenstoffe. — Tomos I y II. — 1929 - 1931.

K. BERNHAUER. — Garungschemisches Praktikum. — Berlín. — 1939.

O. BAYLISS. — The Nature of Enzyme action. — 1919.

J. B. S. HALDANE. — Enzymes. — 1930.

R. WILLSTATTER. — Problems and Methods in Enzyme Research (Trad. inglesa. — 1927.

E. WALDSCHMIDT - LEITZ. — Enzyme Actions and Properties (Trad. inglesa. — 1929.

K. G. FALK. — The Chemistry of Enzyme Action. — 1924.

H. LANGENBUK. — Die Organischen Katalysatoren.

Ergebnisse der Enzymeforschung.

Enzymologia. — 1936 - 1939.

Ergebnisse der Physiologie und experimentellen Pharmakologie.

Annual Review of Biochemistry.—1932 - 1939.

PÁGINAS

E. ADLER y H. V. EULER.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *238,* pág. 233 (1936) 144, 150

E. ADLER, H. HELLSTROM y H. v. EULER.—Z. Physiol. Chem. Tomo *242,* pág. 225 (1936) 152

K. AGNER. — Z. Physiol. Chem. — Tomo *235,* pág. II. (1935) 128

A. AKESSON y H. THEORELL. — Science. — Tomo 90, pág. 299. (1939). 132

R. AMMON y W. DIRSCHERL. — Fermente, Hormone, Vitamine. Pág. 129 (1936). 36, 44, 211

M. L. ANSON. — J. Gen. Physiol. — Tomo *20,* pág. 565 (1937) .. 84, 85

R. ARTHUS.—Thése pour le Doctorat en Medicine.—París (1896). 13

E. G. BALL.—J. Biol. Chem.—Tomo *125,* pág. 51 (1939) 163

E. Bamman y otros.—Ber.—Tomo *71,* pág. 1711 (1938)..... 69
Batelli y Stern.—Comp. rend. Soc. Biol.—Tomos *83* y *84*.... 156, 160
O. Bayliss.—The Nature of Enzyme Action.—Londres. (1919). 20
J. Berger y otros.—Science.—Tomo *90,* pág. 299 (1939)..... 86
M. Bergman y C. Nieman.—J. Biol. Chem.—Tomo *118,* pág. 301 (1937)..... 118
B. Bloch.—Biochem. Z.—Tomo *162,* pág. 149 (1925)..... 171
M. Berthelot.—Chimie Organique fondée sur le synthése.—Tomo II (1860)..... 13
V. H. Booth.—Biochem J.—Tomo *32,* pág. 494 (1938),; *29,* pág. 1732 (1935)..... 33, 163, 169
H. Buchner.—Ber.—Tomo *30* (1897). 13
G. Bunge.—Trattato de Chimica fisolog. e pat.—Pág. 152 (traducción italiana)..... 13, 14
E. Bourquelot.— J. Pharm. et Chim.—Tomo *10,* pág. 361 (1914)..... 35, 72
T. Cahn y J. Houguet.—Actualités scientiriques et Industrielles n *113* (1934)..... 215
L. v. Cholnoky y L. Zechmeister.—Die Chromatographische Adsortionsmethode (1938)..... 44
O. Christian y O. Warburg.—Biochem. Z.—Tomo *254,* pág. 438 (1932); *257,* 492; *258,* 496. Helve. Chim. Act.—Tomo *19,* pág. 179 (1936); Biochem. Z.—Tomo *298,* pág. 150 (1938). Id. id. 150 y 368 (1938)..... 136, 141, 158, 164
Th. B. Coolidge.—J. Biol. Chem. Tomo *123,* pág. 451. (1938). 153
G. T. y C. F. Cori y otros.—Ann. Rev. Biochem.—Pág. 408 (1937)..... 226
H. S. Corran y D. E. Green.—Biochem. Z.—Tomo *22,* pág. 2231 (1938); *33,* 793 (1939). Nature.—Tomo *142,* pág. 149 (1938)..... 142
C. D. Coryell y L. Pauling.—J. Am. Chem. Soc.—Tomo *59,* pág. 633 (1937); Proc. Natl. Acad. Sci.—Tomo *22,* pág. 159 y 210 (1936)..... 117
Crofg Hill.—Transt. Chem. Soc. London.—Pág. 634 (1898). 34, 72
H. D. Dakin.—J. Biol. Chem.—Tomo *6*..... 109
P. Desnuelle y R. Kuhn.—Ber.—Tomo *70 B,* pág. 1907 (1937). 138
J. G. Dewan y D. E. Green.—Biochem. J.—Tomo *32,* pág. 626 (1938). Nature.—Tomo *140,* pág. 1097 (1937). Biochem. J. Tomo *31,* pág. 1074 (1937)..... 142, 174
Ch. Dhere.—La Fluorescence en Biochimie.—Pág. 267.—París. (1939)..... 31
W. Dirscherl y R. Ammon.—Véase *Ammon* y Dirscherl.
M. Dixon.—Perspectives in Biochemistry (Libro - homenaje al Prof. Hopkins).—Pág. 114 (1937); Enzymologia.—Tomo *5,* pág. 198 (1938)..... 154, 173
M. Dixon y C. Lutwak - Mann.—Bioch. J.—Tomo *31,* pág. 1347 (1937)..... 173

A. L. Dounge y J. B. Sumner.—J. Biol. Chem.—Tomo *121,* pág. 417 (1937); 127, 439 (1939) 126, 127
H. Dyckerhoff y W. Grassmann.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *179,* pág. 41 (1928); *205,* 133 (1932) 51, 87
F. Ehrlich y H. Sommerfeld.—Bioch. Z.—Tomo *68,* pág. 266 (1936) 77
S. Edlbacher y H. Bauer.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *254,* pág. 275 (1938) 79
S. Edlbacher y Leuthardt.—Klin. Wochschr.—Tomo *12,* pág. 1843 (1933) 37
S. Edlbacher y A. v. Segesser.—Naturwissenschaften.—Tomo *25,* pág. 557 y 667 (1937) 123
H. v. Euler.—Ark. Kem. Mineral. Geol.—Tomo *12 B,* Nº 44 (1938) 75, 152
H. v. Euler y E. Adler.—Véase Adler y Euler.
H. v. Euler, P. Karrer y F. Zehender.—Helv. Chim. Act.—Tomo *17,* pág. 157 (1934) 37
H. v. Euler *y otros.*—Z. Physiol. Chem.—Tomo *231,* pág. 739 (1935); *240,* 265 (1936) 75, 140
„ Naturwissenschaften.—Tomo *26,* pág. 790 (1938) 143, 214
H. v. Euler y K. Myrbaeck.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *237,* pág. 181 (1935) 144
H. v. Euler, F. Schlenk y H. Hellström.—Ber.—Tomo *71 B,* pág. 1471 (1938) 151
K. G. Falk.—The Chemistry of Enzyme action. (1924) 27
K. Felix y H. Schneider.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *255,* pág. 132 (1938) 33, 79
J. H. Ferguson.—En B. Harrow y C. P. Shervin; Biochemistry, Pág. 408 87
E. Fischer.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *26,* pág. 60 (1898) 32
F. G. Fischer y otros.—Naturwissenschaften.—Tomo *27,* pág. 197 (1939) 144
H. Fischer.—Liebig's Ann.—Tomo *521,* pág. 157 (1935) 113
O. Fischer y G. Schwartz.—Milchw. Forsch.—Tomo *19,* pág. 260 (1938) 163
M. Fontaine y J. Roche.—Compt. rend.—Tomo *206,* pág. 626 (1938) 119
M. Frankel y otros.—Nature.—Tomo *140,* pág. 1015 (1937); Biochem. J. *31,* 1926 (1937) 86
O. v. Fürth.—Lehrb. Physiol Path. Chem.—Tomo I, pág. 348 (1928). 171
J. Giral.—La ciclopoyesis en el organismo animal; págs. 55 y 73.—Madrid (1935).—An. Soc. esp. fis. quim. (1929). —Rev. gen. Colloides.—París (1930).—Melaninas; Rev. Madrid (1937) 54, 77, 94, 141, 171
W. Grassmann y H. Dyckerhoff.—Véase Dyckerhoff y Grassmann.
D. E. Green y H. S. Corran.—Véase Corran y Green.

D. E. Green y J. G. Dewan.—Véase Dewan y Green.
K. Grimlud.—Skand. Arch. Physiol.—Tomo *73,* pág. 109 (1936) 227
G. Günther y H. v. Euler.—Naturwissenschaften.—Tomo *26,* pág. 676 (1938) 143
E. S. Guzmán Barrón y C. L. Lyman.—J. biol. Chem.—Tomo *121,* pág. 275 (1937) 103
E. Haas y E. Negelein.—Biochem. Z.—Tomo *282,* pág. 206 (1935) 153
E. Haas.—Biochem. Z.—Tomo *298,* pág. 378 (1938) 143
M. Hadders y C.Wehmer.—Pflanzenstoff.—Tomos I y II..... 74
B. Harrow y C. P. Shervin.—Biochemistry.—Pág. 313 (1935).. 29
F. Haurowitz.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *232,* págs. 125, 145 y 159 (1935) 117, 127
I. Hausser y E. Kinder.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *B, 41,* pág. 142 (1938) 146
L. Hellerman.—Physiol. Rev.—Tomo *17,* pág. 454 (1937).... 176
L. Hellerhan y M. E. Perkins.—J. Biol. Chem.—Tomo *112,* 175 (1935) 37
E. Helmert y E. Maschmann.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *224,* pág. 56 (1934) 37
H. Hellström, E. Adler y H. v. Euler.—Véase Adler, Hellström y Euler.
H. Hellström y K. Zeile.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *192,* pág. 171 (1930).—Ann. Rev. Biochem. Pág. 542 (1932).... 127
M. Henderson y J. A. P. Millet.—J. Biol. Chem.—Tomo *57,* pág. 559 (1927) 32
R. M. Herriott.—J. Gen. Physiol.—Tomo *21,* pág. 501 (1928).. 85
T. R. Hogness y R. Junowicz - Kocholaty.—J. Biol. Chem.—Tomo *129,* pág. 569 (1939) 132
J. Houguet y T. Cahn.—Véase Cahn y Houguet.
B. C. P. Jansen y H. G. Westenbrink.—Acta brevia. Neerd. Physiol. Pharm. Microbiol.—Tomo *8,* pág. 119 (1938) 167
H. Jost.—Tomo *230,* pág. 96 (1934) 214
M. Jowett y J. H. Quastel.—Bioch. J.—Tomo *29,* pág. 2143 (1935) 160
R. Junowicz - Kocholaty y T. R. Hogness.—Véase Hogness y Junowicz - Kocholaty.
P. Karrer.—Bull. Soc. Chim. Belg..—Tomo *46,* pág. 351 (1937) 138
P. Karrer, H. v. Euler y F. Zehender.—Véase Euler, Karrer y Zehender..
H. D. Kay y S. J. Folley.—Enzymologia.—Tomo I, pág. 48 (1936). 68
D. Keilin.—Proc. Soc. Roy. (London).—Tomo *B, 121,* pág. 173 (1936); idem id.—Tomo *B, 98,* pág. 312 (1936); Nature. Tomo *141,* pág. 870 (1938) 124, 125, 127
D. Keilin y T. Mann.—Nature.—Tomo *142,* pág. 148 (1938); Proc. Roy. Soc. (London).—Tomo *B, 122,* pág. 119 (1937); Nature. *143,* pág. 23 (1939) 119, 131, 172

D. KEILIN y E. F. HARTREE.—Proc. Roy. Soc. (London).—Tomo *B, 124,* pág. 397 (1938) 127
D. KEILIN y otros.—Proc. Roy. Soc. (London).—Tomo B, *125,* pág. 171 (1938) 121
E. KINDER y I. HAUSSER.—Véase HAUSSER y KINDER.
H. W. KINNERSLEY y R. A. PETERS.—Biochem. J.—Tomo *22,* pág. 419 (1928); J. Soc. Chem. Ind.—Tomo *56,* pág. 934 (1937) 166
G. KLEIN y W. ZEISE.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *229,* pág. 204 (1934). 37
B. KNOOP.—Bioch. Z.—Tomo *127,* pág. (1922) 108
H. KRAUT y W. PANTSCHENKO - JUREWICZ.—Biochem. Z.—Tomo *285,* pág. 407 (1936) 22
H. KRAUT y E. TRIA.—Biochem. Z.—Tomo *290,* pág. 277 (1937) 84
H. A. KREBS.—Biochem. Z.—Tomo *29,* pág. 1620 (1935) 164
J. KREIBICH.—Wiener klin. Wochen.—Pág. 710 (1910) 61, 93
F. KUBOWITZ.—Biochem. Z.—Tomo *296,* pág. 443 (1938); *299,* 32 (1938) 38, 172
R. KUHN.—Bull. Soc. Chim. biol.—Tomo *17,* pág. 921 (1935) .. 138
R. KUHN y P. DESNUELLE.—Véase DESNUELLE y KUHN.
M. KUNITZ.—J. Gen. Physiol.—Tomo *22,* pág. 207 (1938) 85
M. KUNITZ y J. H. NORTHROP.—J. Gen. Physiol.—Tomo *16,* págs. 267, 295 y 313; 323 y 339 (1932); *17,* 591 (1934) 29, 37
H. LEBEDEW y O. WARBURG.—Bioch. Z.—Tomo *254,* pág. 438 (1932); *257,* 492; *258,* 496 136
H. LEHMANN y D. M. NEEDHAM.—Biochem. J.—Tomo *31,* pág. 329 (1937) 214
R. LEMBERG.—Ann. Rev. Biochem.—Pág. 431 (1938) 127
R. LEMBERG *y otros.*—Nature.—Tomo *142,* pág. 148 (1938) 123
F. LEUTHARDT y S. ELDBACHER.—Véase ELDBACHER y LEUTHARDT.
C. LENTI.—Arch. sci. biol. (Italia).—Tomo *24,* pág. 169 (1938) 80
F. LIPMANN.—Nature.—Tomo *143,* pág. 281 (1939) 218
M. A. LIPSCHITZ y otros.—J. Biol. Chem.—Tomo *124,* pág. 147 (1938). 166
E. E. LOCKART.—Biochem. J.—Tomo *33,* pág. 613 (1939) 144
K. LOHMANN.—Angew. Chem.—Tomo *50,* pág. 221 (1937); Naturwissenschaften.—Tomo *25,* pág. 26 (1937); Bioch. Z. Tomo *294,* pág. 183 (1937); *286,* 28 (1936); *254,* 332 (1932); Ann. Rev. Biochem. pág. 124 (1938) .. 165, 216, 217
C. L. LYMAN y E. S. GUZMÁN BARRÓN.—Véase GUZMÁN BARRÓN y LYMAN.
T. MANN y D. KEILIN.—Véase KEILIN y MANN.
E. MASCHMANN y E. HELMERT.—Véase HELMERT y MASCHMANN.
F. MEMMEN y R. WILLSTÄTTER.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *161,* pág. 190 (1926) 49
G. MEDWEDEW.—Enzymologia.—Tomo *2,* pág. 1,31 y 53 (1938) 23
O. MEYERHOF *y otros.*—Biochem. Z.—Tomo *292,* pág. 25 (1937) .. 186, 214

J. A. P. Millet y M. Henderson.—Véase Henderson y Millet.
G. A. Millikan.—J. Physiol.—Tomo *87,* pág. 38 P (1936).... 169, 227
T. Mori y E. Yakuhiji.—Acta Phytochim (Japón).—Tomo *10,* pág. 113 (1937); in C. A. *32,* 203 (1938)..... 131
S. Molnar.—Klin. Wochsch.—Tomo *18,* pág. 1191 (1939)..... 166
K. Myrbäck.—Enzymatische Katalysen (Sammlung *"Göschen"*, 1038). 1931)..... 73
K. Myrbäck y H. V. Euler.—Véase Euler y Myrbäck.
D. M. Needham.—Perspectives in Biochemistry (Libro - homenaje al Prof. F. G. Hopkins). Pág. 202 (1937)..... 226
D. M. Needham y H. Lehmann.—Véase Lehmann y Needham.
E. Negelein y E. Haas.—Véase Haas y Negelein.
C. Niemann y M. Bergmann.—Véase Bergmann y Niemann.
J. H. Northrop.—J. Gen. Physiol.—Tomo *13,* pág. 739 y 767 (1930)..... 29
J. H. Northrop y M. Kunitz.—Véase Kunitz y Northrop.
C. Oppenheimer.—Die Fermente und Ihre Wirkungen.—(1921). Leipzig..... 63
S. Ochoa.—Biochem. Z.—Tomo *290,* pág. 62 (1937)..... 214, 223
W. Pantschenko - Jurewicz y H. Kraut.—Véase Kraut y Pantschenko - Jurewicz.
J. K. Parnas.—Biochem. Z.—Tomo *279,* pág. 85 y 94 (1935); Erg. Enzym. Forsch.—Tomo *6,* pág. 57 (1937)..... 217
L. Pauling y C. D. Coryell.—Véase Coryell y Pauling.
M. E. Perkins y L. Hellerman.—Véase Hellerman y Perkins.
R. A. Peters y H. W. Kinnersley.—Véase Kinnersley y Peters
A. Purr.—Bioch. J.—Tomo *28,* pág. 1141 (1934)..... 37
J. H. Quastel y M. Jowett.—Véase Jowett y Quastel.
Peters.
H. S. Raper y A. Wormall.—Bioch. J.—Tomo *19,* pág. 84 (1925)..... 170
H. Rauen y T. Wagner - Jauregg.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *237,* pág. 233 (1935)..... 153
A. F. Richter.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *253,* pág. 193 (1938) 120
J. Roche.—Ann. Rev. Biochem.—Pág.463 (1936); Bull. Soc. biol. *17,* pág. 1473 (1935)..... 118, 123, 132
J. Roche y M. Fontaine.—Véase Fontaine y Roche.
W. C. Rose.—Proceedings. Inst. Med. Chicago.—Tomo *12,* n. 4. (1938)..... 54
H. Rudy.—Fortschr. chem. org. Naturstoffe.—Tomo *2,* pág. 96. (1939)..... 141
P. Rothemund.—J. Am. Chem. Soc.—Tomo *57,* pág. 2010. (1935); *58,* 625. (1936)..... 113
J. Runnström y otros.—Naturwissenschaften.—Tomo *25,* pág. 347. (1937)..... 218
A. v. Segesser y S. Eldbacher.—Véase Eldbacher y Segesser.
O. Schales.—Ber.—Tomo *70B,* pág. 1874. (1937)..... 120

C. P. SHERVIN y B. HARROW.—Véase HARROW y SHERVIN.
F. SCHLENK y otros.—Arki. Kemi. Mineral. Geol.—Tomo *12B.* n. 553 (1938) 149, 151
F. SCHLENK, H. v. EULER y H. HELLSTRÖM.—Véase EULER, HELLSSTRÖM y SCHLENK 151
F. SCHULTZE.—Zentralbl. Allg. Path.—Tomo *20,* pág. 501, (1913) 61, 93
G. SCHWARTZ y O. FISCHER.—Véase FISCHER y SCWARTZ.
G. SCHUDEL y R. WILLSTATTER.—Ber.—Tomo *e1,* pág. 780. (1918) 47
R. V. SOMMERFELD y F. EHRLICH.—Véase EHRLICH y SOMMERFELD.
STERN y BATELLI.—Véase *B*ATELLI y STERN.
K. G. STERN.—Nature.—Tomo *136,* págs. 302 y 305. (1935); J. Biol. Chem, *112,* 661. (1936) 127
E. STOTZ y otros.—J. Biol. Chem.—Tomo *124,* pág. 733 y 745. (1938) 125
F. B. STRAUB.—Nature.—Tomo *143,* pág. 76. (1939); Biochem. J. *33,* 787. (1939); Nature, *141,* 603. (1938) 143, 165
F. B. STRAUB y otros.—Biochem. J.—Tomo *33,* pág. 793. (1939). 143
J. B. SUMNER.—J. Biol. Chem.—Tomo *69,* pág. 435. (1925); *70,* 97. (1926) 29, 80
J. B. SUMNER y A. L. DOUNCE.—Véase DOUNCE y SUMNER.
A. SZENT - GYÖRGYI.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *249,* pág. 211. (1937); Perspectives in Biochemistry. Página 165 (1937). 135, 155, 161
H. TAUBER.—J. Biol. Chem.—Tomo *125,* pág. 191. (1938); Science, *86,* 180. (1937) 166
D. B. TAYLOR.—Enzymologia.——Tomo *2,* pág. 310. (1938) 23, 35
H. THEORELL.—Biochem. Z.—Tomo *298,* pág. 242. (1938); Naturwissenschaften, (1936) 132, 139, 153
H. THEORELL y A. AKESSON.—Science.—Tomo *90,* pág. 67. (1939) 133
P. THOMAS.—Manuel de Biochimie.—Pág. 191. Paris. (1936) ... 18
M. TSWETT.—Ber.—Tomo *24,* pág. 316. (1906) 43
E. TRIA y H. KRAUT.—Véase KRAUT y TRIA.
P. E. VERKADE.—Bull. Soc. Chim. Biol.—Tomo *18,* pág. 989. (1936) 110
C. VOEGTLIN y otros.—J. Pharmacol.—Tomo *48,* pág. 241. (1933) 84
R. WAGNER-JAUREGG.—Wiener. Klin. Wochenschr.—Número *9.* (1936) 140
T. *W*AGNER-JAUREGG y H. RAUEN.—Véase RAUEN y WAGNER-JAUREGG.
A. WALTI.—J. Biol. Chem.—Tomo 119, pág. ci. (1937) 86
O. WARBURG.—Z. Physiol. Chem.—Tomo *92.* (1914); Biochem. Z. *282,* 157. (1935); *282,* 206 ..... 95, 146, 151
O. WARBURG y W. CHRISTIAN.—Véase CHRISTIAN y WARBURG.

O. WARBURG y H. LEBEDER.—Véase LEBEDER y WARBURG.
C. WEHMER y M. HADDERS.—Véase HADDERS y WEHMER.
H. G. WESTENBRINK y B. C. P. JANSEN.—Véase JANSEN y WESTENBRINK.
R. WILLSTATTER.—En E. WALDSCHMIDT-LEITZ.—Enzyme actions. Trad. inglesa. (1929) 13, 18
R. WILLSTÄTTER y F. MEMMEN.—Véase SCHUDEL y WILLSTÄTTER.
R. WILLSTÄTTER y G. SCHDEL.—Véase SCHUDEL *y* WILLSTÄTTER.
R. WILLSTÄTTER y otros..—Z. Physiol. Chem.—Tomo *161,* pág. 190. (1926) 50
A. WORMALD y H. S. RAPER.—Véase RAPER y WORMALD.
E. YAKUSHIJI y T. MORI.—Véase MORI y YAKUSHIJI.
L. ZECHMEISTER y L. v. CHOLNOKY.—Véase CHOLNOKY y ZECHMEISTER.
F. ZEHENDER H. v. EULER y P. KARRER.—Véase EULER, KARRER y ZEHENDER.
K. ZEILE y H. HELLSTRÖM.—Véase HELLSTRÖM y ZEILE.
W. ZEISE y G. KLEIN.— Véase KLEIN y ZEISE.

INDICE

PARTE GENERAL

	Págs.
Bosquejo Histórico	11
Nomenclatura	15
Mecanismo de su acción	18
Factores y Leyes de la acción diastásica	23
Propiedades	28
Especificidad	31
Reversibilidad	34
Activación y Retardación	36
Preparación y Purificación	40
Unidades	44
Métodos de determinación cuantitativa	47
Relaciones de Fermentos entre sí y con Hormonas y Vitaminas	52
Aplicaciones de los Fermentos	57

PARTE DESCRIPTIVA

Sistemática	63
HIDROLASAS	66
Esterasas	66
Fosfatasas y Fosfatesas	67
Lecitasas	69
Colinesterasa	70
Sulfatasas	71
Carbohidrasas	72
Holosidasas	73
Heterosidasas	75
Poliasas	76
Celulasas	76
Pectidasas	77
Aminasas	78
Nucleinaminasas	78
Arginasa e Histidasa	79
Ureasa	80
Hipuricasa (Histozima)	82

Págs.

Proteasas. 82
Pepsina. 84
Triptasas. 85
Papainasas. 85
Quimosina. 86
Protaminasas. 88
DESMOLASAS. 88
OXIDACIONES Y REDUCCIONES INTRAORGANICAS. 90
Autoxidadores. 91
Sistema *BACH-CHODAT*. 93
Teoría de *WARBURG*. 95
„ de *WIELAND*. 97
„ de las cadenas de radicales, de *HABER* y *WILLSTATTER*. 104
„ electrónica. 105
„ de la β-Oxidación de *KNOOP*. 108
RESPIRACION CON HIERRO Y SIN HIERRO. 110
Fermento-Hemina 111
Indofenoloxidasa. 124
Catalasa. 125
Peroxidasa. 128
Citocromos. 130
Fermento respiratorio de *WARBURG*. 134
Sistema Fumárico de *SZEN-GYORGYI*. 135
Fermento Amarillo de *WARBURG*. 136
Flavoproteinas o Fermentos amarillos. 142
Codehidrasas I y II. 144
Fermento Intermedio. 153
Transportadores de Hidrógeno y de Oxígeno. 154
DEHIDRASAS. 156
Alcohol y Aldehidrasas. 158
Acidodehidrasas. 160
Diastasa de *SCHARDINGER*. 163
Cocarboxilasa. 165
Purinodehidrasas. 167
Fenoloxidasas. 169
Hidroliasas e Hidratasas. 173
Mutasas. 173
Luciferasa. 176

CASOS ESPECIALES

FERMENTACION ALCOHOLICA Y GLUCOLISIS. 177
Historia. 177
Origen. 178
Primeras Materias. 180

Págs.

Fermentación alcohólica. 184
Productos intermedios. 185
Esquemas de *MEYERHOF*. 186
Las CINCO Formas de Fermentación de *NEUBERG*. 189
Otras Fermentaciones de la Glucosa. 194
Los Productos accesorios de la Fermentación. 203
Genuina Glucolisis. 204
Fase terminal oxidativa. 209
Lacticolisis. 210
Glucogenolisis 211
El Sistema de Fosforilación. 215
La Glucolisis Aerobia en el Músculo. 219
La Célula Cancerosa. 221
La Contracción muscular en su aspecto Bioquímico. 222

BIBLIOTECA
INVENTARIO 2015
DANIEL COSIO VILLEGAS

EL COLEGIO DE MEXICO
612.0151/G516f/CE
3 905 0335491 W

ESTE LIBRO SE ACABÓ DE IMPRIMIR, AL CUIDADO
DE JOSÉ C. VÁZQUEZ, EL DÍA 27 DE MAYO
DE 1940, EN LOS TALLERES TIPOGRÁFICOS
MODELO, S. A., COMONFORT 44,
MÉXICO, D. F.