

A-87-14

R. 18.254

.REAL ACADEMIA DE FARMACIA

IMPORTANCIA DE LA ENZIMOLOGÍA Y APLICACIONES DE LAS ENZIMAS

DISCURSO LEIDO

POR EL

Dr. D. Florencio Bustinza Lachiondo

EN LA JUNTA PÚBLICA DEL DÍA 29 DE ENERO DE 1943,
PARA SER RECIBIDO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO, Y

CONTESTACION,
EN NOMBRE DE LA ACADEMIA,

POR EL

Dr. D. Angel Santos Ruiz

ACADÉMICO DE NÚMERO



MADRID

1 9 4 3

IMPORTANCIA DE LA ENZIMOLOGÍA
Y APLICACIONES DE LAS ENZIMAS

REAL ACADEMIA DE FARMACIA

IMPORTANCIA DE LA ENZIMOLOGÍA Y APLICACIONES DE LAS ENZIMAS

DISCURSO LEIDO

POR EL

Dr. D. Florencio Bustinza Lachiondo

EN LA JUNTA PÚBLICA DEL DÍA 29 DE ENERO DE 1943,
PARA SER RECIBIDO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO, Y

CONTESTACION,

EN NOMBRE DE LA ACADEMIA,

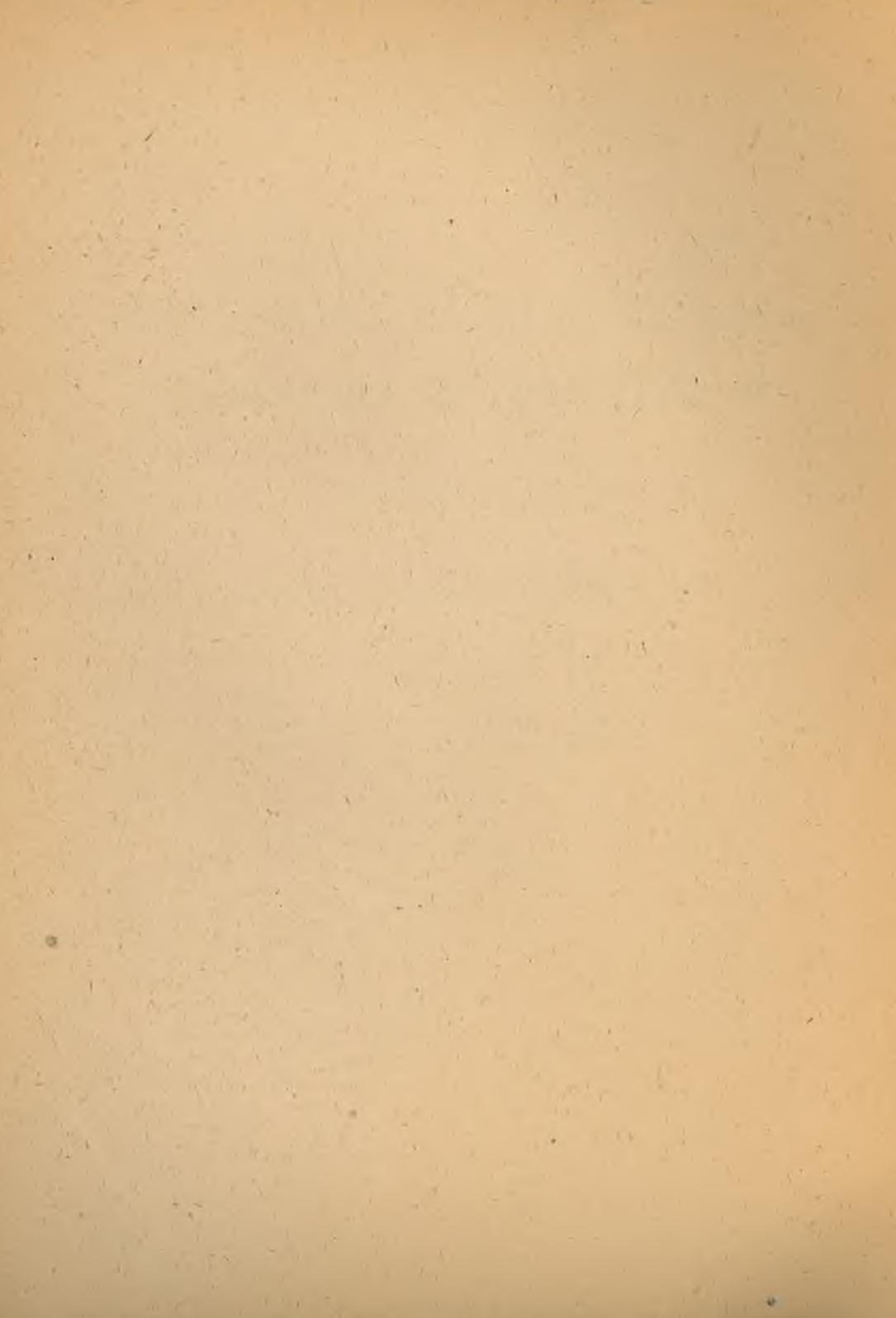
POR EL

Dr. D. Angel Santos Ruiz

ACADÉMICO DE NÚMERO

M A D R I D

1 9 4 3



IMPORTANCIA DE LA ENZIMOLOGÍA Y APLICACIONES DE LAS ENZIMAS

SEÑORES ACADÉMICOS:

Con la sincera y noble inquietud de quien, si carece de méritos que le avalen, tiene consciencia, no obstante, de la responsabilidad inherente a la distinción científica de que se le hace objeto inicio yo la lectura de mi discurso de ingreso en esta docta Corporación.

Sean, pues, mis primeras palabras expresión reverente de gratitud a quienes me han elegido, e invocación de su ánimo para oír y enjuiciar mi modesta labor, en la cual no ha de buscarse la exposición impresionante y cautivadora de nuevos descubrimientos, sino, cuando más, el fruto obtenido tras una tarea regida por el estímulo del trabajo, el afán de corresponder en la medida de mis posibilidades al mérito de la investidura que se me otorga y la observancia rigurosa de aquella norma que es fundamental en toda obra de investigación científica: el culto a la verdad, orientado por la experimentación.

Dicho lo que antecede, un deber gratisimo en su ejecución, y triste en su esencia, me mueve a rendir desde aquí un sentido recuerdo a la memoria del insigne profesor D. Antonio García Varela, investigador profundo, hombre sencillo de corazón, desinteresado e intelectualmente recto, para quien' (como ocurre a las figuras más esclarecidas) la propia personalidad nada significa ante lo vasto de las cuestiones que ocuparon los pensamientos de toda su vida, y del cual he recibido, como discípulo, los primeros alientos en mi función profesional dedicada a la materia objeto de mi discurso.

Cumplido este deber y obtenida la venia de la Presidencia, paso Señores Académicos, a dar lectura al resultado de mi trabajo sobre el temä

IMPORTANCIA DE LA ENZIMOLOGÍA Y APLICACIONES DE LAS ENZIMAS

ALGUNOS DATOS HISTORICOS

Ya en los tiempos bíblicos se practicaba la fermentación alcohólica; es decir, se transformaba el zumo de uva en vino.

Moisés, en el *Génesis*, cap. 9, v. 20-21, dice: "Y Noé, que era labrador, comenzó a labrar la tierra y plantó una viña, y bebiendo de su vino quedó embriagado".

En los tiempos de *Moisés*, el *pan fermentado con levadura* era el de uso más corriente, pero también se conocía el *pan ázimo*.

Moisés, al instituir, por orden de Dios, la *Fiesta de la Pascua* como recuerdo de la liberación del pueblo judío al huir del yugo faraónico, dice en el *Exodo*, cap. 12, v. 8: "Las carnes (se refiere al cordero Pascual) las comerán aquella noche asadas al fuego y panes ázimos, o sin levadura, con lechugas silvestres". En el mismo capítulo dice, en el v. 18 s.: "El día 14 del primer mes (se refiere al mes de Nisán), desde la tarde, comeréis los ázimos hasta el día 21 del mismo mes por la tarde. Durante siete días no se hallará levadura en vuestras casas. Quien comiera pan con levadura, ora sea extranjero, ora sea natural del país, sea borrada su alma de Israel. Nada habéis de comer con levadura. Usaréis el *pan ázimo* en todas vuestras casas."

El *pan ázimo* recuerda la prisa y ansiedad del momento de partida, y lo que pretendía *Moisés* con esta prohibición era hacer patente al pueblo la pureza con que debía acercarse a las cosas divinas.

Desde los tiempos más antiguos se emplea el *jugo de la higuera para coagular a la leche* (coagulación que hoy sabemos es debida a la existencia en aquél de un fermento: la *sycocquimasa*). *Homero*, en el *canto V de la Iliada*, al describir las luchas de griegos y troyanos, en los versos finales, dice:

"El dios de la guerra, Ares (Marte), es herido en combate por Diómides, ayudado por Palas (Minerva). Dolorido y sangrando de la herida, acude Ares a lamentarse al padre de los dioses, Zeus (Júpiter). Este, después de reprender severamente al belicoso dios, ordena a Péon cure al doliente, lo que realiza derramando sobre la herida remedios indicados, y le sana sin gran esfuerzo, ya que Ares no es un mortal."

Y entonces, usando un artificio al que tan aficionados eran los poetas griegos, para dar una idea comparativa de la rapidez de la curación, dice en tres versos el poeta lo que sigue (1):

Ὡς δ' ὅτ' ὀπὸς γάλα λευκὸν ἐπειγόμενος συνέπηξεν,
ὄγρον ἕὸν μάλα δ' ὄκα περιστρέφεται κοκόωντι·
ὡς ἄρα κάρπαλίμως ἴησατο θεῶν Ἄρηα.

En el primer verso vemos emplea *Homero* la palabra ὀπός, que, en su sentido más general, la utilizaban los griegos para cualquier jugo procedente de árboles, pero más concretamente, como en el caso presente, para designar el *lechoso jugo de la higuera* con el que coagulaban la leche. Por ello, la traducción justa de los versos precedentes es la que sigue:

"Y así como el jugo de la higuera cuando es batido vivamente coagula la blanca leche, a pesar de ser líquido, con el vivo impulso del que los mezcla, así también cura (se refiere a Péon) rápidamente al impetuoso Ares."

En tiempos de *Cristo* era conocido el hecho de que una pequeña parte de *levadura* (que hoy la consideramos como *fermento vivo* que elabora diversos *fermentos solubles*) es capaz de provocar efectos grandes, como vemos en la *parábola de la levadura*, en la que *Nuestro Señor Jesucristo* (Evangelio de San Mateo, cap. 13, v. 33) dice: *"Semejante es el reino de los cielos a la levadura que toma una mujer y la esconde en tres medidas de harina hasta que queda toda fermentada"*. Cada una de dichas medidas equivalía, según el Evangelio explicado del *Cardenal Gomá* (Vol. II, p. 278, ed. 1940), a unos 13 litros.

Jesús, al contraponer tal gran cantidad de harina con la pequeña masa de levadura, quiso poner de relieve la fuerza de fermentación de la levadura, con la que simboliza la vitalidad de la Iglesia y su fuerza intrínseca para transformar al mundo.

"Mirad, decía San Pablo (I, Cor., 5, 6.), qué pequeña cantidad de levadura basta para hacer fermentar una gran cantidad de pan." Y advierte el mismo *Santo*: *"También aquí (como en la parábola de la mostaza) describe el Salvador el poderoso y rápido crecimiento que puede producir una causa mínima en apariencia"*.

Y desde los tiempos de *Cristo* damos un salto hasta el siglo XVII. En 1680, *Leuwenhoeck* examina al microscopio la levadura de cerveza y la describe como *"organismo de forma globular"*.

En 1814, *Kirchoff*, en San Petersburgo, realizó la *sacarificación del almidón*, empleando polvo de glúten.

En 1819, *Thenard* señaló que el agua oxigenada (que él había descubierto en 1818) es descompuesta por los extractos de tejidos animales y vegetales, y en particular por la fibrina (2).

En 1823, *Dubrumfault* confirmó la experiencia de Kirchoff empleando polvo de malta para sacarificar al almidón, y en 1830 afirma que "la propiedad del gluten o de la cebada germinada es debida a una sustancia soluble en el agua".

En 1826, *Mitscherlich* observa que el agua que tuvo en maceración levadura de cerveza invierte a la sacarosa, de igual forma que lo hacen los ácidos diluídos.

En 1826, *Desmazières* observó la presencia de microorganismos en los medios azucarados en fermentación, pero fué *Pasteur* quien más adelante estableció la necesidad de las células de la levadura para la transformación del azúcar.

Y llegamos al 1833, año memorable, en que *Payen y Pesoz* aislaron por primera vez el principio activo de la cebada germinada, precipitando el extracto acuoso de malta mediante el alcohol. Así obtuvieron el primer fermento soluble, al que dieron el nombre de *diastasa*, por la singular propiedad que posee de separar la envoltura de los glóbulos de fécula de su materia anterior. *Payen y Persoz* definieron las propiedades de esa *diastasa* y vieron que su acción sacarificante sobre el engrudo de almidón desaparecía hirviendo previamente su disolución acuosa (3).

El descubrimiento de *Payen y Persoz* abrió una era nueva en la Química Biológica, pues fué el punto de partida de una serie de descubrimientos que han permitido explicar fenómenos cuyo mecanismo era desconocido.

En 1835, *Caignard Latour*, por un lado, y *Kutsing y Schwann*, por otro, demuestran que la levadura de cerveza está compuesta de organismos vivos capaces de reproducirse por gemación y que no actúan probablemente sobre el azúcar sino por algún efecto de su vegetación y de su vida.

En 1836, *Schwann* bautizó con el nombre de *pepsina* al principio activo del jugo gástrico, que fué aislado más tarde, en 1839, por *Wasman*. En 1836, *Purkinje* señaló la acción proteolítica del jugo pancreático.

En 1837, *Liebig y Wöhler* observaron que la *amigdalina*, aislada en 1830 por *Robiquet y Boutron*, a partir de las almendras amargas, era hidrolizada, en presencia del agua, por un fermento soluble, la *emulsina*, contenida en las almendras amargas y muy especialmente en las dulces.

En 1841, *Mialhe* descubre la *ptialina* ó diastasa salivar (4).

En 1844, *Valetin* descubre la *amilasa pancreática* (5)

En 1855 comenzó el ilustre bienhechor de la Humanidad, *Pasteur*, sus investigaciones sobre la fermentación alcohólica. Confirmó la afirmación de *Caignard Latour*, y entabló una polémica con el eminente químico alemán *Liebig*, y estableció definitivamente la misión de la levadura en la transformación del azúcar de la uva en alcohol

y CO₂. Inicia Pasteur otros trabajos para demostrar que el azúcar de la leche es transformado en ácido láctico por un microbio y que otros gérmenes son los causantes de la fermentación butírica y de la acética. Demuestra también que la generación espontánea no es posible, y de sus investigaciones surge la asepsia y la antisepsia, y las industrias de fermentación catalizadas por fermentos vivos se van desarrollando, cimentándose sobre bases científicas.

Existía una relación directa entre la presencia de ciertos microorganismos y las fermentaciones, para Pasteur: "*No hay jamás fermentación alcohólica sin que haya simultáneamente organismos globulares con vida que se desarrollan y multiplican, engendrando nuevos glóbulos (se refiere Pasteur a las levaduras), y la fermentación alcohólica no está en correlación con la muerte o la putrefacción de dichas células*". Por otra parte, Liebig admitía la existencia de sustancias que provocaban la fermentación independientemente de la levadura.

En 1858, Traube emite la teoría de que todas las fermentaciones producidas por los seres vivos son debidas a diastasas.

En 1860, Berthelot aísla, a partir de la levadura, la invertasa, precipitando su extracto acuoso mediante el alcohol.

En 1861, Brucke observa que la pepsina se adhiere a las partículas de fosfato cálcico, de azufre o de colestereína, de las que es fácil de separar disolviendo el adsorbente en reactivos apropiados.

En 1862, Danilewsky, operando con extractos pancreáticos, de los que la lipasa se había eliminado con magnesia, logra preparar triplicina casi exenta de diastasa, fijando el fermento proteolítico sobre algodón nitrado.

En 1863, Schönbein (6) observó que los fermentos solubles por él conocidos, diastasa y emulsina, presentaban la propiedad de descomponer al agua oxigenada, pero que perdían dicha propiedad, así como su función específica, por la ebullición, y dedujo que todas las diastasas gozaban de la propiedad de descomponer al agua oxigenada, y en consecuencia en dicha época se sustentaba la opinión de que los fermentos solubles eran sustancias precipitables por el alcohol que actuaban en pequeñísima cantidad, produciendo efectos grandes y que eran capaces de descomponer al agua oxigenada.

También observó Schönbein que la propiedad de descomponer al agua oxigenada va acompañada de la de azulear a la tintura de guayaco, y creyó que ambas reacciones eran debidas a la misma causa. Señaló, sin embargo, como excepción, a la levadura de cerveza, que ejerce acción catalítica sobre el agua oxigenada y que no azulea a la tintura de guayaco.

Schönbein también conocía la propiedad que tienen algunos jugos vegetales de azulear directamente a la tintura de guayaco, y, en cambio, otros solamente la azuleaban en presencia del agua oxigenada.

En 1867, *Kuhne* señaló ciertas diferencias entre la digestión estomacal e intestinal, dando el nombre de *tripsina* al fermento pancreático.

En 1883, *Hikorokuro Yoshida* presentó una comunicación a la Sociedad Química de Tokio indicando que el *ennegrecimiento* al aire de la *laca japonesa* o *Urushi* (jugo lechoso del *Rhus vernicifera*) era provocado por la acción de un fermento soluble, que, actuando sobre el ácido urúsquico, o *laccol*, lo oxidaba merced al oxígeno del aire y lo transformaba en ácido oxiurúsquico.

En 1889, *Green* (7) extrajo la *lipasa* de las semillas de ricino en germinación.

En 1891, *Jacobson* manifestó que la *propiedad de descomponer al agua oxigenada* por los fermentos solubles entonces conocidos debía atribuirse a una *sustancia especial*, pues observó que a 69° la *emulsina* pierde rápidamente el poder de descomponer al agua oxigenada, en tanto que la propiedad de desdoblarse a la amigdalina no ha desaparecido. Notó también que los ácidos, en pequeña cantidad, disminuyen su acción sobre el agua oxigenada, pero aumentan su acción hidrolizante sobre la amigdalina.

En 1893, *G. Bertrand* recibió de Tonkin una muestra de látex puro del *Rhus succdánea*, y sus trabajos, realizados sin conocer la comunicación de Yoshida sobre el *Urushi*, le permitieron establecer de modo cierto y por primera vez la existencia de un fermento soluble, una *oxidasa*, a la que llamó *laccasa* (8).

En 1894, *E. Fischer* señala que la *invertasa desdobra* a los *alfa-glucósidos* y que el complejo enzimático de la *emulsina desdobra* a los *beta-glucósidos*. Con su célebre *simil cerradura y llave* representó objetivamente la relación entre *substrato* y *enzima*.

Todos estos descubrimientos hacían pensar en que la fermentación alcohólica podría ser, en definitiva, obra de *fermentos solubles* segregados por la levadura. Los intentos para demostrarlo fracasaron, hasta que *Buchner*, en 1897, realizó su famosa experiencia: trituró levadura con arena de cuarzo y tierra de infusorios y exprimió la pasta en una prensa hidráulica a presiones de 300 a 500 atmósferas, obteniendo un jugo desprovisto de células y que representaba el jugo celular de la levadura; dicho jugo, vertido sobre disoluciones de glucosa esterilizadas, provocaba la transformación del azúcar en alcohol y anhídrido carbónico, sin que en dicho líquido apareciese ninguna célula viva. Con ello demostró Buchner que *la fermentación alcohólica era producida por una sustancia*, a la que llamó *zimasa* o *alcoholasa* (hoy sabemos que se trata de un complejo de fermentos), segregada por la levadura, lo cual reconciliaba las teorías de Liebig y Pasteur y se establecía la diferencia entre *fermentos vivos* (levaduras, bacterias, células vivas, en una palabra), cuya acción podía ser paralizada por el empleo de antisépticos y *fermentos solubles*, o

enzimas, o *diastasas*, de cuyas disoluciones acuosas podían ser precipitadas por el alcohol y cuya actividad se inhibía definitivamente por ebullición de sus disoluciones acuosas (*).

Linossier, en 1898 (10), designó con el nombre de *peroxidasa* al fermento capaz de azulear la tintura de guayaco en presencia del agua oxigenada, pero confundía dicha propiedad con la de descomponer al agua oxigenada. Su mérito estriba en haber escogido un término feliz para designar una propiedad tan conocida desde *Schönbein*, quien había demostrado que el agua oxigenada sola no ejercía acción sobre el guayaco y que esta acción se manifiesta por adición de sangre, gluten o harina. El error de *Linossier* estaba en pensar que la *peroxidasa* también descomponía al agua oxigenada. Fué *Lepinois* quien, en 1899, indicó que la propiedad de descomponer al agua oxigenada debía atribuirse a otro fermento especial.

Por fin, *Oscar Loew*, en 1901, aisló de las hojas del tabaco un fermento, la *catalasa*, capaz de descomponer a las disoluciones del hidróperóxido en agua y en oxígeno molecular (11).

En 1906, *Chodat* y *Rouge* extraen la *sycoquimasa*, del látex de la higuera (12).

En 1909, *Sörensen* estableció sobre bases indiscutibles la noción de que la actividad de los fermentos solubles está íntimamente ligada a la *reacción del medio*, expresada por su concentración en hidrogeniones (13).

En 1918, dan a conocer *Willstätter* y discípulos sus nuevos métodos de *purificación* de fermentos por *adsorción* (14).

En 1926, *Sumner* obtiene la *ureasa cristalizada* (15).

En 1930, *Northrop* obtiene la *pepsina cristalizada* (16). En el mismo año, *Zeile* y *Hellström* demostraron que el complejo *hierroporfirina* debe ser considerado como el grupo activo de la *catalasa* (17).

En 1931, *Dubos* aisla de determinados microbios del suelo cultivados en medios adecuados, fermentos capaces de hidrolizar los especiales polisacáridos de las cápsulas de los neumococos (18).

En 1932, en el laboratorio de *Sumner* se logró obtener la *anti-ureasa*, el anticuerpo más puro hasta entonces logrado, aunque no en forma cristalina (19). En el mismo año, *Meldrum* y *Roughton* aislaron de los eritrocitos un singular fermento, la *carbónico-anhidrasa*, y *Warburg* y *Christian* aislaron de la levadura el *fermento amarillo*, que en 1934 *Theorell* lo purifica y lo obtiene cristalizado (20).

En 1937, *Sumner* y *Dounce* obtienen la *catalasa cristalizada*; *Kuhn* y *Rudy* sintetizan el *fermento amarillo completo*, y *Euber* y *Vestin* sintetizan la *cocarboxilasa*, obteniéndola a partir de la *aneurina* o *vitamina B₁*.

(*) El término de *enzima* fué propuesto por *Kühne* en 1878, y significa «en la levadura» (cita del profesor *Rocasolano*, «Tratado de Bioquímica», pág. 424, 1928).

PREPARACION DE LAS ENZIMAS

Las *enzimas* son catalizadores orgánicos coloidales elaborados por las células. Intervienen en los variadísimos procesos bioquímicos que se desarrollan en los seres vivos y que se caracterizan por la facilidad, rapidez y suavidad con que se desenvuelven a las temperaturas bajas en los organismos. Son aceleradores de las reacciones, determinando el desarrollo instantáneo o rápido a temperaturas ordinarias de procesos químicos, que sin ellos se realizan de modo espontáneo, pero excesivamente lento.

Las *enzimas* pueden existir en forma solubilizada en las células, *lio-enzimas*, y fácilmente extraíbles o en forma insoluble adheridas a la estructura celular, *endoenzimas*, y que pueden extraerse desgarrando previamente las células o en forma insoluble por unión química con el protoplasma celular, *desmoenzimas*, y sólo extraíbles, aunque no siempre, por hidrólisis del protoplasma mediante los álcalis, los ácidos o por fermentos proteolíticos.

Aunque todas las células disponen de un arsenal variado de *fermentos*, algunas células están especializadas (células glandulares) en la elaboración de determinados fermentos, que pueden pasar al exterior de las células, difundiéndose en los medios de cultivo (caso de las levaduras, bacterias, mohos), o formando parte de las secreciones, o ser derramadas a la sangre, como ocurre en determinadas circunstancias. Algunos *fermentos* quedan en las células donde se han originado, y de ellas salen más tarde bajo influencias estudiadas por el profesor Roger (*).

La mayor parte de los fermentos solubles se extraen fácilmente, especialmente de los órganos vegetales, con agua, a la que se adiciona cloroformo o éter para disminuir la semipermeabilidad de las células. Para ello se trituran los órganos ya directamente con agua, o por intermedio de arena cuarzosa y agua; se prosigue la maceración durante veinticuatro o cuarenta y ocho horas a baja temperatura y en presencia de un antiséptico (gotas de tuluol o de cloroformo o éter); de los extractos acuosos se precipita el fermento por adición de tres o cuatro veces su volumen de alcohol de 96°. Es conveniente *efectuar la precipitación en el punto isoelectrico* que corresponde a un mínimo de dispersión y a una máxima floculabilidad del fermento (20 bis).

La acción destructiva del alcohol sobre los enzimas es pequeña cuando el contacto también lo es, pero, sin embargo, hoy se tiende a sustituir el alcohol por la acetona en la precipitación de *enzimas*.

La *peroxidasa* se disuelve en alcohol de 50°, y la *emulsina* conti-

(*) La presencia de sacarosa o de bilis en el intestino ejerce a través de la membrana celular acción atractiva sobre la *invertasa* de las células intestinales, provocando su salida.

núa activa aun a disoluciones alcohólicas con 90° de alcohol (Bourquelot).

La *lipasa* del páncreas se disuelve perfectamente en el agua, pero las *lipasas* de las semillas oleaginosas no son hidrosolubles. *Falk* extrae la lipasa del ricino con disolución 1,5 N de ClNa y luego dializa el líquido, pues se precipita junto con los albuminones solubles en esa concentración salina. El *profesor Obdulio Fernández*, en sus investigaciones sobre lipasas de semillas oleaginosas, ha obtenido poco rendimiento por el procedimiento de *Falk* (21).

La *sycocquimasa* de la higuera se extrae fácilmente por el método del *profesor R. Chodat*, con disolución acuosa de ClNa al 8 por 100 (21 bis).

La *amilasa* de la yema de huevo adherida a lipoides (*zimolipoides*) se extrae por el éter (22).

A veces, como en el caso de la obtención de *invertasa* de levadura, se favorece la liberación de los enzimas por *autólisis* con toluol. Cuando se opera con órganos animales, que fácilmente se alteran, es necesario operar con órganos frescos, rápidamente y macerando a bajas temperaturas.

Cuando se desea evitar la alteración por autólisis se deshidratan las células u órganos mediante *acetona*, y así se obtienen polvos celulares, glandulares o de órganos que contienen los *fermentos activos*.

La *glicerina* se utiliza a veces para preparar extractos que contienen los fermentos; así, se emplean los extractos glicerizados de *Russula delica* o de *R. foetens* como fuente de *tirosinasa* para el diagnóstico de la tirosina en los esputos. La *lipasa pancreática* se disuelve bien en la glicerina.

La obtención de *fermentos puros* es necesaria para estudiar su naturaleza y su acción, por lo que se comprenden los esfuerzos de los especialistas para lograr *fermentos puros*.

Por repetidas precipitaciones y redisoluciones se ha conseguido en algunos casos obtener *preparados enzimáticos* de mayor actividad; es decir, con el enzima más puro.

Se recurre para la *purificación* a las técnicas de: *diálisis*, *electrodiálisis*, *ultrafiltración* y *métodos de adsorción* del *profesor Wilstätter* y colaboradores (23).

La *purificación* por *diálisis* se practica en sacos de colodión frente al agua destilada. Se les priva a los fermentos de sales minerales, y a veces se disminuye así algo de su actividad. La técnica de *diálisis* es suficiente para purificar a la *amilasa salivar*, pero no para la *amilasa de la malta*, que necesita, además de la diálisis ordinaria, una *electrodiálisis* (24).

La adición de electrólitos apropiados a estas *diastases* desmineralizadas les restituye parcial o totalmente su actividad, afirmando *Maignon* "que los elementos minerales inseparables de toda diastasa,

en lugar de representar impurezas, constituyen, por el contrario, la parte esencial del catalizador" (25).

Las experiencias de *Bruck*, en 1861, y las de *Daniłewski*, en 1862 (que ya he dado a conocer), pueden considerarse como los primeros intentos de adsorción de fermentos.

Agitando disoluciones de fermentos con polvo fino de talco, caolín, carbón, etc., se logra sustraer a la disolución parte del fermento, pues se observa que disminuye su actividad. Si provocamos la formación de un precipitado en el seno de ciertas disoluciones enzimáticas (formación de fosfato de calcio, por ejemplo), se comprueba que la disolución filtrada ha perdido parte de su actividad por haber quedado fijado el fermento al precipitado.

Herissey observó la adsorción de la *emulsina* por el tanino (26). *Ambard*, la adsorción de la *amilasa* por el almidón crudo (27). *Effront* (28), la adsorción de la *amilasa*, *pepsina* y *ptialina* por la celulosa (conviene tener esto en cuenta al filtrar disoluciones de fermentos a través de papel de filtro).

Vood sumerge en una disolución impura de *tripsina* tiras de papel de filtro; luego las deseca en corriente de aire caliente. La celulosa adsorbe al fermento. Si sumergimos luego las tiras desecadas en agua fría, el fermento se disuelve y las impurezas quedan totalmente adheridas al papel. Esta técnica le ha permitido a *Vood* obtener preparados activos de *tripsina*.

Las técnicas de *Willstätter* y colaboradores (fundadas en trabajos de *Michaelis* y *Ehrenreich*) consisten en arrancar, en separar de los medios que los contienen a los fermentos, adsorbiéndoles mediante un soporte adecuado a la naturaleza del fermento (geles de hidróxido aluminico, de hidróxido férrico, caolín, etc.). Así se obtienen adsorbatos de los que se libera luego el fermento—elución—por reactivos especiales. La *lipasa* se separa de su adsorbato con colesteroína, disolviendo a ésta en el éter; la *amilasa* se separa de su adsorbato con almidón crudo, mediante engrudo de almidón, y la *invertina* de su adsorbato, con hidróxido aluminico, mediante disolución acuosa amoniacal o disolución de fosfato amónico (29).

Las experiencias de *Willstätter* quedaron coronadas brillantemente al conseguir obtener del rábano rústico la *peroxidasa* pura y más tarde lograr separar la *amilasa*, la *tripsina* y la *lipasa pancreática* (basándose en su distinto comportamiento frente a la alúmina y al caolín) (30).

NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ENZIMAS

La determinación de la naturaleza química de las enzimas es una de las especiales directrices hacia las que se orientan las investigaciones modernas enzimológicas (31 y 31 bis).

El mayor avance conseguido en el campo de la Enzimología fué el aislamiento de varios *enzimas* y *zimógenos cristalizados*, pues la cristalización es garantía de pureza de los preparados.

En 1926, *Sumner* obtuvo de la *Cannavalia ensiformis*, *ureasa* en cristales octaédricos. El análisis reveló tratarse de una *globulina* (32).

Waldschmidt-Leitz y *Steigerwaldt* sostienen que pueden digerir la proteína de la *ureasa* cristalina sin inactivar al fermento, pero este aserto fué desaprobado por la escuela americana, pues *Sumner*, *Kirk* y *Howell* demostraron que a pH 4,3 los cristales de *ureasa* son rápidamente inactivados y digeridos por *pepsina* y que la velocidad de la inactivación es paralela a la digestión.

En 1930, *Northrop* cristalizó la *pepsina* en pirámides hexagonales y con las reacciones propias de las proteínas (33). En 1932, *Northrop* y *Kunitz* obtuvieron *tripsina cristalizada* y con las reacciones de proteínas.

En 1935 y 1936, esos mismos investigadores obtuvieron cristalizados: el *quimotripsinógeno*, la *quimotripsina* y el *tripsinógeno*.

En 1937, *Sumner* y *Dounce* cristalizaron la *catálasa*.

Según *Willstätter*, los fermentos constituyen cuerpos químicos que difieren entre sí. Lo que llamamos *fermento activo* (*holofermento*) es en realidad un sistema enzimático en el que el cuerpo de estructura química bien definida y determinada, el *cofermento* o *coenzima*, desempeña un papel capital merced a su estado de dispersión, pues está situado en la superficie de un soporte coloidal (el *apofermento* o *apoenzima*) que es igualmente elemento indispensable del sistema. El cuerpo activo es responsable de la especificidad y el soporte de la actividad catalítica y de la estabilidad del sistema.

Para *Willstätter*, el fermento activo consta pues: de un *coloide frecuentemente proteico* (*), cuya superficie está recubierta quizá, formando capa monomolecular, por la *sustancia química activa*, y debido a esta enorme superficie muestra gran actividad sobre las reacciones entre los cuerpos que se ponen en contacto con la superficie coloidal.

Si se separa el *cofermento* de la superficie de su soporte coloidal y se emplea aislado, vemos que ya no ejerce su peculiar acción catalítica del fermento completo. Ocurre lo mismo si coagulamos el soporte coloidal o si destruimos su estructura superficial; es decir, que *ambas fracciones unidas, el cofermento + apofermento, forman el holofermento o fermento activo completo*.

En cuanto a la *naturaleza química* de la *sustancia activa*, está probado ser de naturaleza *proteica* para la *ureasa*, *pepsina* y *tripsina*. Otros fermentos contienen *hierro*, formando parte de un núcleo or-

(*) *Willstätter* ha aislado *amilasa pancreática* de gran pureza y de gran actividad que no da las reacciones de las proteínas y que apenas se colorea con SO_4H_2 en presencia de α -náftol.

gánico parecido al de la *hematina*, tales son: los *citocromos a, b y c*, la *catalasa*, las *peroxidases* y el fermento respiratorio (*Atmungsferment de Warburg*), cuyo hierro ferroso, por la acción del oxígeno, pasa a férrico en la fase final de la oxidación en el proceso respiratorio.

En la *catalasa*, los trabajos de Zeile y Hellström (34) han demostrado que el *complejo ferro-porfirina* debe ser el grupo activo de la *hepatocatalasa*, lo cual han comprobado con medidas fotospectrométricas, pues a medida que se va purificando el fermento la relación entre la actividad catalítica y su riqueza en hierro-porfirina, medida por la intensidad del espectro de absorción, es constante. Con la *catalasa cristalizada* de Sumner y Dounce se ha llegado a la misma conclusión.

Los trabajos de Kuhn, Hand y Florkin (34 bis) también han demostrado que la *peroxidasa es una hierro-porfirina*.

Según Kubowitz, la *polifenoloxidasa* de la patata es un *cuproproteido*, cuya actividad es proporcional a su riqueza en cobre.

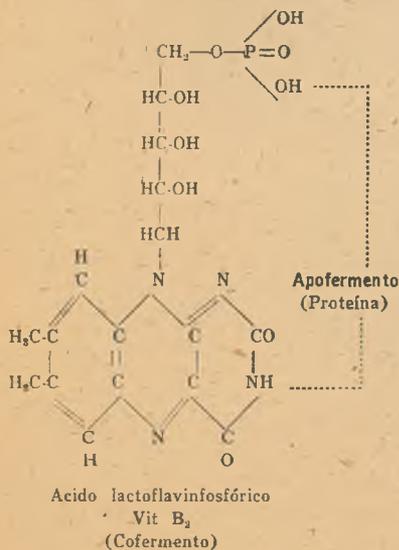
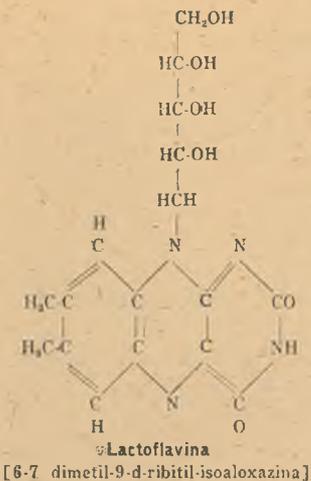
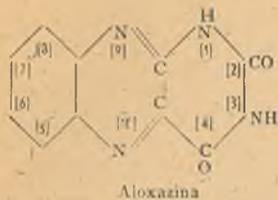
Hay fermentos cuyo grupo prostético o *cofermento* es un *cuerpo químico bien definido*, así: el *fermento amarillo* es un derivado de la *isoaloxazima*, las *codehidrasas I y II* son *nucleótidos* de la *amida nicotínica* y de la *adenina* y la *co-carboxilasa* es el *pirofosfato de aneurina*.

El fermento amarillo.

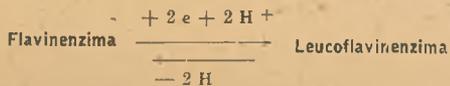
En 1932, Warburg y Christian aislaron de la levadura el llamado *fermento amarillo* o *flavinenzima*, cuyo cofermento es el *ácido lactoflavinofosfórico* o *vitamina B₂* (la 6-7 dimetil-9-d-ribitil-isoaloxazina esterificada por el ácido fosfórico). Este cofermento, unido a una proteína, forma el *fermento amarillo*, que es una dehidrasa que toma el hidrógeno no directamente de las sustancias orgánicas, sino de su substrato específico: las *dihidrocodehidrasas*, que previamente toman el hidrógeno de las sustancias orgánicas de los tejidos.

La *lactoflavina* de los alimentos se *fosforiliza* en la mucosa intestinal, y uniéndose con una proteína se convierte en el *fermento amarillo activo* para el metabolismo. Al tomar el hidrógeno el fermento amarillo pasa a *leucoderivado* y éste por oxidación regenera a la flavinenzima, formando así un *sistema de óxidoreducción*, y por eso el *fermento amarillo* interviene en los procesos de óxidoreducción de los tejidos en la fase anaerobia preliminar en la que no interviene el oxígeno.

Kuhn y Rudy han *sintetizado* el *fermento amarillo* uniendo el ácido lactoflavin-fosfórico natural o el sintético con una proteína específica, constituyendo este brillante hecho la *primera síntesis lograda de un fermento*.



Flavinzima
o
Fermento Amarillo
de
Warburg y Christian

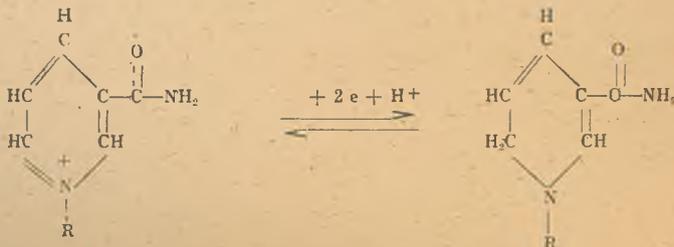
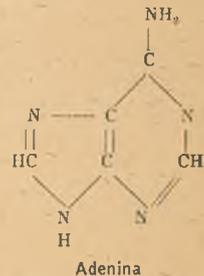
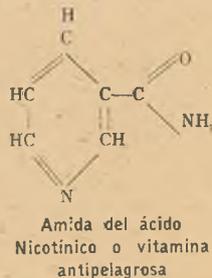
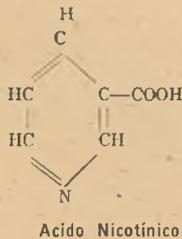


Las codehidrasas.

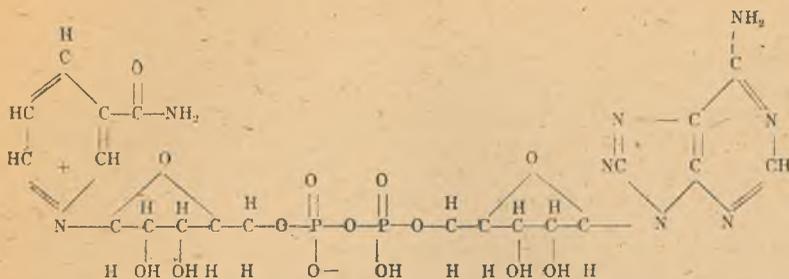
Las *codehidrasas*, unidas a un soporte proteico, constituyen los fermentos activos o *dehidrasas* que aceptan el hidrógeno, transformándose en *dihidrodehidrasas*, y éstas ceden el hidrógeno, regenerándose por intermedio de la flavinenzima, que pasa a leucoderivado.

La *codehidrasa I* = *cozimas de Euler y Myrbäck*, se encuentra en todas las células y está constituida por el nucleótido de la *amida nicotínica* y el nucleótido de la *adenina*. La *codehidrasa II*, descubierta en los hematies de caballo por *Warburg y Christian*, tiene una molécula más de ácido fosfórico que la *codehidrasa I*.

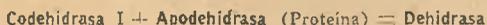
Vemos que entre los componentes de las *codehidrasas* está la *vitamina P P* o *antipelagrosa* (amida del ácido nicotínico), cuyo núcleo pirídico puede actuar como *acceptor de hidrógeno* (véase fórmula) y este hidrógeno puede luego ser vehiculado, por ejemplo, a la *flavinenzima*, regenerándose el núcleo pirídico de la nicotinamida, por lo que se deduce la importancia de la *vitamina P P* y de las *dehidrasas* en los *procesos de óxidorreducción*.



El núcleo pirídico de la amida nicotínica puede hidrogenarse reversiblemente.

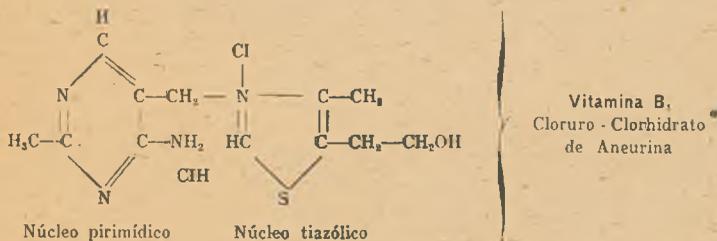


Codehidrasa I = Cozimas = nucleótido de la amida nicotínica + nucleótido de la adenina

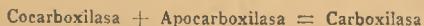
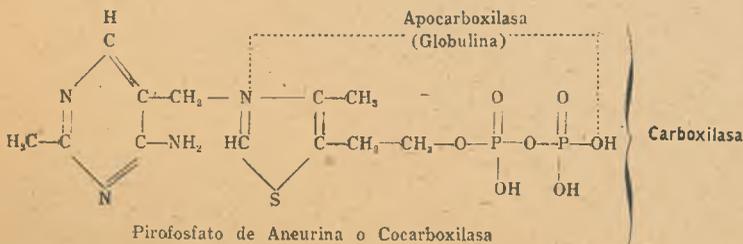


La carboxilasa.

La *vitamina B₁* (cloruro-clorhidrato de aneurina), que posee, como se aprecia en su fórmula, un *núcleo pirimídico* y otro *tiazólico*, entra en la constitución de un cofermento, la *cocarboxilasa*, que es el *pirofosfato de la aneurina*, aislado puro por *Lohman*, y el cual, unido a una globulina, la *apocarboxilasa*, forma el fermento activo completo, la *carboxilasa*, sintetizada en 1937 por *Euler* y *Vestin*.



Vitamina B₁
Cloruro - Clorhidrato
de Aneurina



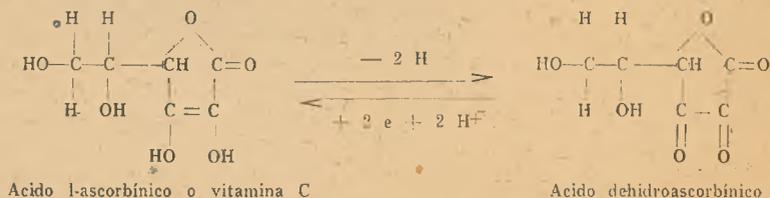
La *carboxilasa* es un fermento que actúa en la fase de *descarboxilación* de los cetoácidos (por ejemplo, el pirúvico), una de las últimas fases anaerobias del metabolismo, y por ello se comprende que al faltar la vitamina B₁, se acumulen en los órganos y tejidos, especialmente en el cerebro, ciertos ácidos como el láctico y el pirúvico, que serán responsables de algunos de los síntomas nerviosos de la avitaminosis B₁.

Las recientes observaciones de *Krebs* y *Egleston* demuestran que en el organismo animal (hígado) el ácido pirúvico desaparece por un proceso de carboxilación, combinándose con una molécula de CO₂ y transformándose en ácido oxalacético, siendo catalizada esta reacción por la *carboxilasa* (34 trip).

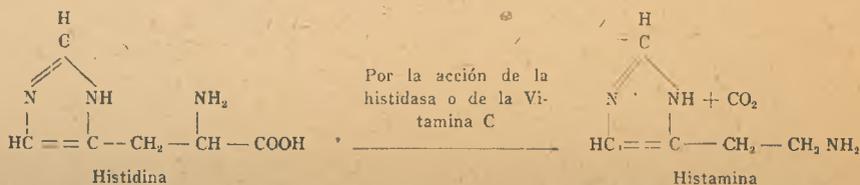
* * *

Vemos, por los ejemplos que acabo de citar, que algunas *vitaminas* entran en la constitución química de ciertos *fermentos* tan fundamentales para los organismos por cuanto intervienen en los procesos de óxidorreducción, *existiendo íntima relación entre fermentos y vitaminas*, habiendo propuesto Von Fuller para estas últimas el nombre de *vitazimas*.

El mismo ácido *l*-ascorbínico, o *vitamina C*, es considerado por algunos, por su gran poder reductor y por ser vehiculizador del hidrógeno, como *verdadero fermento que interviene en los procesos de óxidorreducción*, pues por pérdida de dos átomos de hidrógeno por oxidación se convierte en ácido dehidroascorbínico, y éste por fijación de hidrógeno regenera nuevamente al *l*-ascorbínico.



Holtz ha observado que la *vitamina C*, o ácido *l*-ascorbínico, se comporta frente a la *histidina* como una *histidasa*, pues observa que por su acción se produce *histamina* (35).



Más adelante me ocuparé de la *influencia del ácido 1-ascorbínico sobre otros fermentos* y también de la *ascórbicooxidasa*.

Langenbeck ha obtenido catalizadores orgánicos de acción semejante con algunos fermentos y les llama *modelos de fermentos: aminos primarias*, como modelo de *carboxilasa*; la *isatina*, como modelo de *dehidrasas*; sustancias del tipo *benzoicarbínol*, como modelo de *esterasas*, etcétera (36).

ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LOS FERMENTOS SOLUBLES

Los *fermentos solubles* actúan en pequenísimas dosis. Según *Kuhn*, una molécula de *catalasa* es capaz de descomponer en un segundo 100.000 moléculas de agua oxigenada; 1 gramo de *pepsina* de título 3.000 es capaz de digerir 3.000 gramos de clara de huevo coagulada en condiciones convenientes de temperatura y pH; 1 gramo de *cuajo* es capaz de coagular varios litros de leche, etc., es decir, que hay desproporción entre la masa del fermento y la del sustrato sobre el cual actúa.

El *calor* influye en la actividad de los fermentos, favoreciéndolos, como lo hace en las reacciones químicas habituales; pero aquí la *regla R. G. T. de Van T. Hoff* no se aplica con tanta sencillez, pues se trata de sistemas microheterogéneos, y el valor de Q_{10} varía de 1,3 a 3.

Existe para cada *fermento* una *temperatura mínima* a la que comienza a manifestar su actividad, una *óptima* a la que adquiere su mayor actividad, y una *máxima*, por encima de la cual el fermento no manifiesta actividad por haberse desnaturalizado.

Por regla general los *fermentos* manifiestan una mayor actividad entre 35° y 50°; pero el óptimo térmico para la *catalasa* es entre 0° y 20°, y en cambio, la coagulación de la leche por la *sycóquimasa* de la higuera se realiza entre 75° y 80°. Téngase presente que el *óptimo de temperatura* puede variar con arreglo al pH a que se trabaje.

Es interesante consignar que varios fermentos ejercen el óptimo de su acción a temperatura superior a la que puede soportar el vegetal de donde se extraen; así, la *dextrinasa* lo hace a 64°; la *invertasa*, a 55°, y la *sycóquimasa*, a 75-80°.

Es criterio generalizado en Fermentología el que las disoluciones acuosas de los *fermentos* se *inactivan* a 100°, y esta inactivación se estima como prueba de tratarse de una acción enzimática, pues los catalizadores no enzimáticos resisten siempre esa temperatura.

La *temperatura mortal* para cada *fermento* varía con la acidez iónica de la disolución, con el tiempo que se mantiene el *fermento* a una temperatura elevada y con la naturaleza de los cuerpos presentes en la reacción.

Los *fermentos* son más frágiles en presencia del agua pura que en

presencia de su substrato específico; así, la *invertasa* resiste mejor el calor en presencia de sacarosa.

Si expresamos la actividad de un *fermento* soluble por la cantidad de sustancia que transforma en la unidad de tiempo, se puede comprobar que pequeñas variaciones en la concentración de hidrogeniones ejercen influencia considerable en dicha actividad. Fué *Sorensen* (37), director del Laboratorio de Carlsberg de Copenhague, el primero en establecer sobre bases científicas indiscutibles la noción de que la *actividad enzimática está íntimamente ligada a la reacción del medio*, expresada por su concentración en iones hidrógeno.

Así, la *catalasa*, *ureasa*, *uricasa* y *alantoinasa* manifiestan su óptimo a un pH 7; la *pepsina* del jugo gástrico, entre 1,4 y 1,8, y la *arginasa*, a pH 9,5. Para las *amilasas* el pH varía según su procedencia; así, la *takadiastasa* y la *amilasa* de la *malta* tienen un óptimo a 4,5, y en cambio la *ptialina* trabaja en las proximidades de la neutralidad.

El pH óptimo depende también de la presencia de impurezas; así, la *lipasa gástrica*, cuyo pH es 5 en su medio natural, convenientemente purificada manifiesta su mayor actividad a pH 8. El pH óptimo para la *lipasa pancreática* es 7,5; pero en tanto que la actividad del jugo pancreático o de la *lipasa bruta* en él contenida baja rápidamente por ligera acidificación, el *fermento purificado* (según *Wilstätter*) saponifica bien las grasas a pH 4,5.

Se conocen ciertas *sustancias* que *activan* a los *fermentos* y otras que *refrenan* su acción y que incluso los *inactivan* o *paralizan*.

Langenbeck considera al *grupo activo* de los *fermentos* como una molécula grande en la que habrá uno o varios *grupos funcionales activos* capaces de actuar sobre el substrato y otros *grupos activantes* que por su presencia determinan el desarrollo de las reacciones. Las *sustancias* que *inhiben* la acción de los *fermentos* son las que afectan a los *grupos activos*, y las que *retardan* disminuyendo la velocidad de la reacción, son las que actúan sobre los *grupos activantes*.

Para ciertos *fermentos* se ha establecido que su *grupo activo* puede ser el CO, o el COOH, o el NH₂, por cuanto se ha observado que su acción es impedida por los reactivos que se fijan sobre esos radicales, o el grupo SH, pues las oxidaciones suaves le inactivan al transformarle en disulfuro (caso de la *ureasa*).

Herriot, de sus trabajos sobre inactivación de la *pepsina* por el yodo, ha deducido que el yodo se fija sobre la *tirosina* y que este aminoácido es indispensable para que la *pepsina* muestre su actividad.

La *papaína* y la *cathepsina* son activadas por el CNH y por el SH₂, y en cambio, esos gases y el CO paralizan a la *catalasa* y a los demás *fermentos* que contienen hierro (*peroxidases* y *fermento respiratorio*).

Las *sales de metales pesados* de Hg, Ag, Pb, los cianuros, etc., actuarán *inhibiendo* a los *fermentos* por modificación de su soporte coloidal.

Los *iones oxálico*, precipitando a los *iones calcio*, impiden que se transforme la *protrombina* en *trombina*, con lo que se evita la coagu-

lación de la sangre oxalátandola. Esos mismos iones oxálico y por el mismo mecanismo impiden la acción de la *pectasa* sobre las disoluciones de ácido péctico y la acción del *cuajo animal* sobre la leche; pero en cambio, la *sycocúimasa* no es afectada por la adición de oxalato amónico a la leche, por cuanto los iones calcio no son indispensables para su actuación.

Según *Jobling* y *Petersen*, las sales alcalinas de los ácidos grasos eténicos inhiben la acción de la *tripsina* (38).

Estudiando los factores que inactivan a la *lipasa* del ricino y de las *esterasas*, se ha llegado a la conclusión de que se trata de una transformación tautomérica. Según *Falk*, si el grupo activo de esos fermentos está representado por una *ligadura enol-lactima* —C-(OH) = N—, la *inactivación* se produciría por su transformación en *acetolactama* —CO—NH—.

El etanol es muy empleado para precipitar los enzimas de sus disoluciones acuosas, y en general se estima que su acción destructiva es pequeña siempre que el contacto sea corto. Las *peroxididas* continúan manifestando actividad a disoluciones al 50 % de etanol, y según *Bourquelot*, la emulsina es aún activa en disolución al 90 % de alcohol etílico.

Hay un fermento singular, la *clorofilasa*, que acompaña a la *clorofila* en las plantas, y que es capaz en medio alcohólico de producir la *alcoholisis* de aquel pigmento, reemplazando el radical *fitilo* de la clorofila por el radical *etilo*. Se trata de un fermento bastante estable y no se destruye por ebullición en alcohol durante corto tiempo, pero sí hirviéndolo con agua.

El modo de acción de las *sulfamidas* (tan utilizadas en la actualidad) ha permanecido oscuro hasta el descubrimiento por *Stamp* y *Grelen* de las *antisulfamidas*, y por *Woods* y *Fildes*, de la acción *antisulfamida* del ácido *p-aminobenzoico*. Las *sulfamidas* no ejercen acción bactericida, sino *acción bacteriostática*, pues en cualquier momento se puede provocar el desarrollo de un cultivo bloqueado agregando ácido *p-aminobenzoico* en proporción conveniente. El ácido *p-aminobenzoico* es un componente esencial de un *sistema enzimático* que cataliza determinadas reacciones químicas en estrecha relación con la reproducción bacteriana. Las *sulfamidas* actúan inhibiendo esas reacciones y, por lo tanto, la reproducción bacteriana *por bloqueo del ácido p-aminobenzoico* (38 bis).

En cuanto a los *activadores* de los fermentos, se conocen diversas categorías.

Willstätter, *Grassmann* y *Ambros* han demostrado que el CNH ejerce acción *quinasa* para la *papaína*, cuyo dominio de especificidad aumenta. La *papaína* hidroliza débilmente a la gelatina y no ataca a la peptona, y en cambio, la *papaína* + CNH provoca hidrólisis acentuada de la gelatina y desdobra a las peptonas. También la proteasa (*bromelina*) de la piña americana es *activada por el CNH*,

Grassmann y colaboradores han demostrado la activación de la *paína* y *proteasas* similares por la *cisteína* o por la *glutaciona* reducida.

Rockwood y *Husa* han demostrado la acción activante de ciertos aminoácidos sobre la *ureasa* (39). Para *Bertrand*, los aminoácidos serían un *cofermento* necesario a la actividad de la *amilasa* del polvo de páncreas.

Según *Caujolle* y *Laffite*, el ion Na en forma de *ClNa* aumenta la actividad de las *amilasas salivar y pancreática* (40).

Se sospecha que el *SCNK presente en la saliva* puede estar en relación la actividad de la *ptialina*, puesto que en la saliva humana la dosis de sulfocianuro es de 12 mgs. %, mucho mayor que en la saliva de perro, que sólo alcanza 0,43 mgs. % y en la cual no existe *amilasa* (41).

El *sulfato de manganeso* es, según los trabajos del *prof. Ob. Fernández*, un *activador* de las *lipasas* de las semillas oleaginosas.

El ion *magnésico* a débil concentración es *activador* de ciertas *fosfatasa*s (por ejemplo, la *glicerofosfatasa* de los huesos, de los hematíes, de la levadura, etc.).

La *amiloquinasa* activa a las *amilasas* de los granos en reposo.

La *cozimasa* es indispensable para poner en actividad a la *zimasa*.

El *jugo pancreático* contiene una *proquinasa* que se activa por los *iones de calcio* y se transforma en *quinasa* que activa a la *tripsina*.

Se ha venido creyendo que el *tripsinógeno* del páncreas era inactivo en el sentido proteolítico hasta que alcanzaba al intestino, en donde la *enteroquinasa* segregada por la mucosa intestinal lo transformaba en *tripsina activa*. Las investigaciones de *Waldschmidt-Leitz* han demostrado (42) que el *tripsinógeno*, o como dicho investigador prefiere llamarlo simplemente, *tripsina*, tiene una actividad proteolítica específica propia, puesto que hidroliza a la peptona y a algunas proteínas sencillas (*clupeína*, *escombrina*), pero no actúa sobre la caseína ni sobre la gelatina; después de activado por la *enteroquinasa* el fermento puede atacar a estas proteínas, en tanto que aquellas son atacadas ahora más vigorosamente que antes de la intervención de la *enteroquinasa*. El término *tripsinógeno* debe, pues, sustituirse por el de *tripsina*, en tanto que la *enteroquinasa* es simplemente un *activador de una tripsina ya activa*.

La *bilis* ejerce acción *antizimótica* sobre los fermentos microbianos, dificulta la producción de fermentos por los microbios anaerobios intestinales y disminuye la acción de dichos fermentos sobre las sustancias fermentescibles. Por esto la *bilis*, aunque desprovista de poder antiséptico, puede ser considerada *por su acción antizimótica como líquido antipútrido* (Roger).

La *bilis* ejerce influencia *zimosténica*; es decir, es capaz de acrecentar la actividad de otros fermentos, *refuerza la actividad amilolítica* del jugo pancreático, permite a la *lactasa* intestinal actuar sobre la *lactosa*; introducida en el duodeno, provoca la salida del jugo pan-

creático, constituyendo, según *Mellamby*, el excitante específico de dicha secreción; también contribuye a hacer salir de las células intestinales a los *fermentos digestivos*, ejerciendo una especial atracción con respecto a la *invertasa*. Activa la acción de la *lipasa pancreática* y de la *lipasa intestinal*, pues disminuye la tensión superficial y determina el que las gotas de grasa se hagan muy pequeñas.

Las paredes intestinales contienen una *mucino-coagulasa* que coagula a la mucina, transformándola del estado líquido en una masa concreta; pues bien, la *bilis* se opone a la acción de dicha *mucinasa*, impidiendo la precipitación y concreción del mucus (43). Por esta razón el mucus permanece líquido en el tramo superior del intestino y se coagula cuando lo hace en el tramo terminal. Así se explica la formación de *seudomembranas* en las colitis muco-membranosas por coagulación del mucus, que se puede atribuir a una *insuficiencia biliar* o a *secreción grande de mucus* o de *fermento coagulante* (*). La *opoterapia biliar* está indicada en las *colitis muco-membranosas*.

El *ácido ascórbico*, o *vitamina C* (considerado por algunos como verdadero fermento soluble o enzima), es capaz de activar o de inhibir a otras *enzimas*. Así, según *Purr*, es activador específico de las *amilasas* de origen animal (*ptialina*, *amílase del páncreas de cerdo*, *amílase del hígado de conejo*), y en cambio *inhibe* a las *amilasas vegetales* (por ejemplo, a la de la *malta*).

La *digestión péptica* de la caseína es inhibida por el jugo de naranja y por la *vitamina C*.

La *catepsina* purificada es activada por el *ácido ascórbico*, pero no ocurre lo mismo con la *papaína*, y éste es un medio de diferenciar esas dos próximas *proteasas*, que tienen otros caracteres comunes.

La *vitamina C* activa a la *arginasa* si en la disolución de ésta hay indicios de *iones de cobre*; en cambio, la *ureasa* es inhibida por el *ácido ascórbico* + Cu^{++} , y la *tirosinasa*, la *catálase* y la *fosfatasa* se inhiben por el *ácido ascórbico* solo.

El *ácido ascórbico*, a su vez, puede ser influido por otros fermentos.

Tauber y *Kleiner* han aislado (44) un activo fermento del pericarpio de la *Cucurbita máxima*, la *oxidasa-ascórbica*, que es capaz de oxidar instantáneamente al *ácido ascórbico*. Han llegado a obtener dicho fermento en condiciones de suficiente pureza; no da las reacciones de las otras *oxidases*, y hasta el presente no se ha descubierto

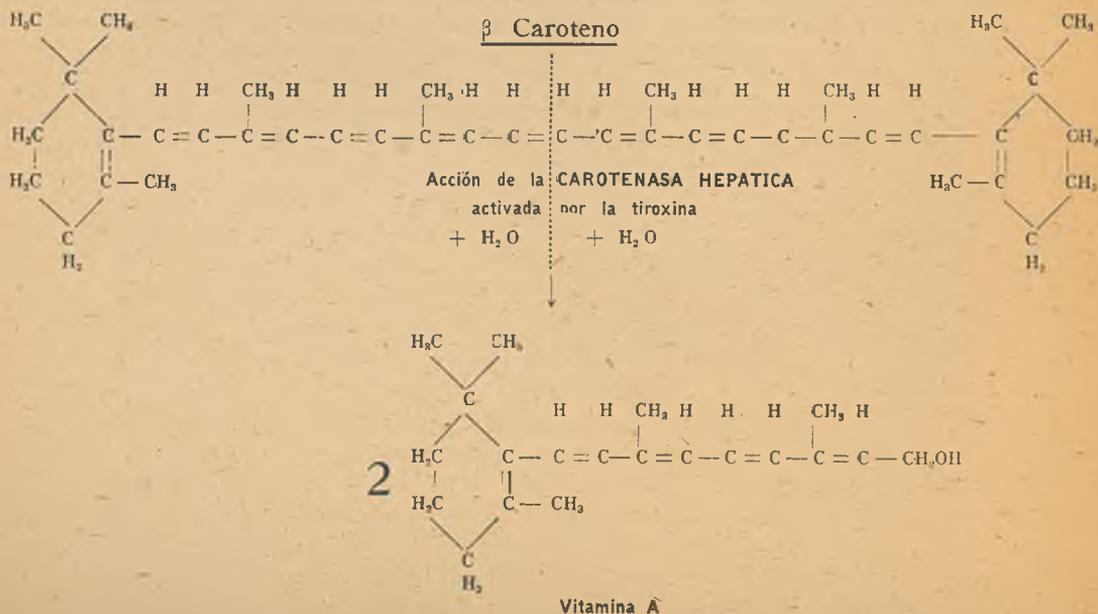
(*) Según las investigaciones de *Riva*, las heces normales no contienen *mucinasa*, pero en las enfermedades con *enteritis mucomembranosa* se halla dicho fermento y en proporción que varía con su riqueza en mucus. Según *Tremolières*, la presencia de *mucinasa* en las heces puede estimarse como patológica, y en algunos casos existe en tan gran cantidad que pasa a la sangre, y por esta razón el suero de enfermos con *enteritis mucomembranosa* es capaz de precipitar a las disoluciones de mucina, en tanto que el suero normal es inactivo.

otro sustrato (aparte de la vitamina C) sobre el cual sea capaz de actuar dicha *oxidasa*.

Esta singular *oxidasa* existe también, según *Stones*, en diversos vegetales, como: *plátano, col, zanahoria, pepino, patata, lechuga y espinaca*.

La *ascórbico-oxidasa* puede ser utilizada para *valorar* el *ácido ascórbico* mediante la *técnica de Tauber y Kleiner*, que consiste en determinar el poder reductor de un extracto de tejido frente al *2-6 diclorofenol-indofenol*, hacer actuar sobre otra porción de extracto la *ascórbico-oxidasa* y volver a hacer otra segunda valoración con el mismo indicador; la diferencia entre ambas determinaciones expresará exactamente el contenido en vitamina C, toda vez que en la segunda determinación dicha vitamina ha sido oxidada.

Un ejemplo de la *interacción entre fermentos, hormonas y vitaminas* lo tenemos en el caso de la transformación de la *carotina* en *vitamina A*. El *hígado* es el órgano que preside a los destinos de la vitamina A; él la elabora a expensas de *pigmentos carotinoides* contenidos en los alimentos vegetales y la almacena para ir la cediendo después al organismo. El mecanismo por el cual el hígado rompe al *β-caroteno* y lo transforma en *vitamina A* es por la intervención de un fermento, la *carotenasa*, que introduce dos moléculas de agua en la molécula del *β-caroteno* y le escinde en dos moléculas de *vitamina A*, cuerpo incoloro y con función de alcohol en la terminación de la cadena.



Stepp (45) ha demostrado que la *tiroxina* de la glándula tiroides es indispensable para que la *carotinasas* pueda actuar. *De modo que, a partir de un pigmento vegetal, un fermento hepático, con el concurso o activado por una hormona, elabora una vitamina.*

ESPECIFICIDAD

La *especificidad de las acciones enzimáticas* constituye uno de los problemas más interesantes de la Enzimología.

La *pureza* con que hoy se aíslan los fermentos, algunos incluso cristalizados, facilita el estudio de su acción y permite deducir su *grado de especificidad*.

Cada fermento actúa sobre una sustancia determinada o sobre grupo de sustancias que constituye el sustrato, *adaptándose fermento y sustrato* (decía Fischer) *como la llave lo hace en su cerradura*.

Las *esterasas* catalizan la hidrólisis de los ésteres, las *amilasas* transforman al almidón en maltosa, las *proteasas* hidrolizan a las proteínas, la *catalasa* descompone al hidróperóxido, las *polifenoloxidasas* catalizan la oxidación de determinadas sustancias de naturaleza fenólica, la *emulsina* cataliza la hidrólisis de los β -glucósidos, etc.

Parece evidente que existe *especificidad absoluta* en los grandes grupos de fermentos, porque los que actúan sobre los glúcidos no lo hacen sobre los lípidos ni sobre los prótidos, ni los que actúan sobre los lípidos lo hacen sobre los glúcidos ni sobre los prótidos, pero entre los diversos fermentos de cada grupo la *especificidad* en todos los casos ya no es tan concreta (46).

Ya en 1894, *E. Fischer* demostró que la *invertasa* desdobra únicamente a los glucósidos α de la *d-glucosa* y que el complejo enzimático de la *emulsina* desdobra a los β -glucósidos de la *d-glucosa*, pero no a los α -glucósidos de ese mismo azúcar (47). Esta particularidad se aprovecha para distinguir las dos series de glucósidos y para separarlos cuando están mezclados. Con la *invertasa* se diagnostica *sacarina*, y con la *emulsina*, los β -glucósidos en las plantas (ambas técnicas son del profesor *Bourquelot* (48).

Según la nueva teoría sobre especificidad de las carbohidrasas de *R. Weidenhagen*, dichos enzimas ya no se clasifican por su sustratos (*sacarasa, maltasa, rafinasa*, etc.), sino por la naturaleza química del cuerpo azucarado que son capaces de desdoblar; con ello se circunscribe su especificidad a la constitución y a la disposición *espacial* de los azúcares glucosídicamente copulados.

Weidenhagen admite cinco *glucosidasas*, con las que se aclaran

todos los desdoblamientos enzimáticos conocidos de los glucósidos y de los *oligosacáridos*, también glucósidos (49).

Enzimas	Substrato
α - glucosidasa.	α - glucósidos: maltosa, sacarosa, turanosa, melecitosa.
β - glucosidasa.	β - glucósidos: gencibiosa, celobiosa.
α - galactosidasa.	α - galactósidos: melibiosa, rafinosa.
β - galactosidasa.	β - galactósidos: lactosa.
β - h - fructosidasa.	β - h - metilfructósidos: sacarosa, rafinosa, gencianosa.

La *maltasa* aparece como α -glucosidasa pura, mientras que la *sacarasa* puede actuar como α -glucosidasa (*inwertasa intestinal*) o como β -h-fructosidasa, de lo que resulta que la sacarosa puede considerarse como glucósido y como fructósido, pues se desdobra hidrolíticamente tanto por la α -glucosidasa como por la β -h-fructosidasa.

Weidenhagen afirma que la *maltasa* es capaz de desdoblar a la *sacarosa*. *Karström* (50) siembra una cepa *B. coli* en medio con maltosa, y obtiene un preparado con elevado poder para desdoblar a la maltosa, pero no a la *sacarosa*, lo cual parece estar en contradicción con el aserto de *Weidenhagen*.

La constitución de los dos derivados de *sacarosa*: la *rafinosa* y la *melecitosa*, así como la constitución de la *gencionosa* y del *hesperonal*, de una serie variada de glucósidos y también de la *inulina* y la *irina*, se aclaró completamente mediante el *análisis enzimático*.

En la desintegración enzimática del almidón observó *Kuhn* que intervienen dos tipos de *amilasas*: la α y la β -*amilasa*, según la configuración de la *maltosa* que liberan al actuar sobre el almidón.

Para *Van Klinkenberg*, el almidón está formado por dos compuestos: uno que entra en un 64 % y está en forma β -glucosídica y sólo es desdoblable por la β -*amilasa*, y otro entra en un 36 % y posee estructura α -glucosídica y sólo se hidroliza por la α -*amilasa*. El *glucógeno* se desintegra casi completamente por la α -*amilasa*, o sea que está casi exclusivamente formado por α -*almidón*.

Las *amilasas* de *origen animal* son casi exclusivamente α -*amilasas*, en tanto que en los *vegetales* hay α y β -*amilasas*.

Más adelante me ocuparé de la especificidad de las *polisacaridasas*, elaboradas por ciertos microbios del suelo frente a los polisacáridos capsulares de los *neumococos*.

El grupo de los *fermentos proteolíticos* ha permitido investigar la estructura de las proteínas, llegándose a la conclusión de que la copulación tipo amido-carboxilica de los amido-ácidos debe considerarse como la única clase de enlace cierto y característico de los *albuminoides*.

Los *métodos enzimáticos* han adquirido particular significación en el aclaramiento estructural de los *ácidos nucleínicos*, y la dilucidación de la estructura del *ácido timonucleínico* sólo ha sido posible por la cuidadosa, suave y progresiva desintegración enzimática.

Las *amino-peptidasas* y *proteasas* preparadas por *Waldschmidt-Leitz* han permitido desintegrar ciertas fracciones hormonales, obteniendo de ellas sustancias más puras (51).

Los *fermentos de defensa*, de los que me ocuparé más adelante, son específicos para desintegrar las especiales proteínas que penetran, natural o artificialmente, en el torrente circulatorio.

En los tejidos proliferantes animales existen péptidos formados, no totalmente, sino probablemente en parte, por *péptidos* integrados totalmente por *amino-ácidos destrógiros* o que sólo contienen algunas piezas de esta configuración estereoquímica (52). *Waldschmidt-Leitz* tiene una técnica especial para el descubrimiento del *fermento* que hidroliza los *péptidos destrógiros específicos del cáncer*.

REVERSIBILIDAD DE LAS ACCIONES DIASTASICAS

Ya en 1892 *Tammann* sugirió la idea de que las hidrólisis catalizadas por enzimas debían ser *reversibles*.

Corresponde a *Croft Hill* el mérito de la primera síntesis bioquímica, pues haciendo actuar *maltasa* sobre una disolución de glucosa obtuvo una biosa, aunque no pudo identificarla como maltosa (53).

Diversas experiencias de *Emmerling*, *E. Fischer* y *Armstrong* y otros no condujeron a nada decisivo.

Los trabajos de *Potter*, hacia 1906, demostraron la posibilidad, utilizando *preparados pancreáticos*, de preparar oleatos de alcoholes de la serie grasa y también mono-oleína del glicerol.

Bourquelot y *Bridel*, tratando de condensar en presencia de *emulsina* la d-glucosa con la saligenina en medio alcohólico, obtuvieron, no la salicina, sino el glucósido del alcohol. Este descubrimiento, logrado por azar, fué el punto de partida para la obtención por síntesis, mediante la *emulsina*, de diversos glucósidos de la d-glucosa y diversos alcoholes primarios, secundarios y terciarios de la serie grasa y de la serie aromática.

Precisamente, basada en la *acción reversible de la emulsina* hay una técnica de *Bridel* para caracterizar a la glucosa cuando está mezclada con otros azúcares reductores o en líquidos complejos, como son los extractos vegetales, y que consiste en utilizar la *emulsina* y el alcohol metílico en condiciones apropiadas (54). Si existe glucosa en el líquido problema, se une por la acción de la *emulsina* al alcohol metílico y se aprecia la síntesis del glucósido correspondiente por el cambio del poder rotatorio y por disminución del poder reductor.

En el caso de la *emulsina*, la *reversibilidad* está probada, pero en otros fermentos no está clara.

Rosenthaler, de sus estudios, dedujo que el *fermento sintetizante*

no es el mismo que el hidrolítico. Hoy, siguiendo la terminología de Von Euber, se hace terminar en esa a los fermentos que catalizan las síntesis bioquímicas (*lipesas, fosfatasas, etc.*).

El profesor *Obdulio Fernández* y el Sr. *Pizarroso*, trabajando con semillas oleaginosas, hallaron en corto número la cualidad sintetizante, prueba de que el fermento sintetizador de ésteres glicéricos (*lipasa*) no es igual que la lipasa, que cataliza su hidrólisis. La *semilla de adormidera*, de acción medianamente hidrolítica, se revela como la de mayor poder sintetizante (entre las semillas por dichos investigadores estudiadas), y el *ricino*, de notable poder hidrolítico, se conduce como de escaso valor en la síntesis de los glicéridos.

Existe en la levadura un interesante catalizador biológico, la *carbolicasa*, con una acción enzimática excepcional. Se trata de un fermento de función genuinamente sintetizadora, concatenadora, que cataliza la formación de cadenas rectilíneas carbonadas polieslabonadas. Merced a dicho fermento, se puede llegar por síntesis bioquímica a obtener cuerpos ópticamente activos; por ejemplo, la *l-efedrina*, que es un alcaloide. Para ello se siembra la levadura en líquido azucarado que contenga 3 % de aldehído benzoico; al cabo de veinticuatro-cuarenta y ocho horas de fermentación a 35° se puede extraer, mediante el éter, el fenilacetilcarbinol, debido a que la *carbolicasa* ha unido al aldehído benzoico con el etanal procedente de la fermentación alcohólica, y el fenilacetilcarbinol, por hidrogenación en presencia de la metilamina, se convierte en *l-efedrina*, idéntica al alcaloide natural.

LEY DE ACCION

La acción de los fermentos se desenvuelve ordinariamente según la ley de acción de las masas y se facilita por determinadas circunstancias: pH apropiado, temperatura conveniente, presencia de ciertos iones, etc.

La velocidad de las reacciones catalizadas por fermentos depende de la concentración del fermento y de la del substrato.

Si los productos de la reacción son eliminados por insolubilización o porque se desprendan por tratarse de gases (caso de la *catalasa*, que descompone al agua oxigenada en agua y oxígeno molecular), entonces la acción del fermento se continúa indefinidamente (en el caso de la catalasa hasta la descomposición total del agua oxigenada).

En el caso de la *invertasa*, la fructosa, que se origina en la hidrólisis de la sacarosa, se fija sobre el fermento y lo paraliza, y entonces su actividad disminuye con el tiempo, durante el que actúa y tiende a hacerse igual a cero.

Con frecuencia se lee que los fermentos actúan a grandes diluciones y que la masa del fermento no juega papel. Esta última afirmación no es exacta, pues a diluciones convenientes se ve que la ve-

locidad de la acción depende de la concentración del fermento, lo que lleva a considerar *la acción de los fermentos como encajada dentro de la ley de acción de las masas.*

En el caso de la acción del sistema *peroxidasa-hidroperóxido* sobre el pirogalol, la cantidad de púrpurogalina formada es proporcional a la concentración del fermento hasta la concentración límite, a partir de la cual ya no hay aumento de efecto (*Chodat*).

Para estudiar *la ley de acción de un fermento* es necesario estudiar su velocidad de acción a concentraciones diferentes, teniendo en cuenta la concentración del substrato y el tiempo invertido en lograr un efecto determinado.

Los trabajos de *Senter* y *Bach* demuestran que la reacción de descomposición del agua oxigenada por la *catalasa* sigue de modo satisfactorio la ley de acción de las masas, expresada en todas las experiencias por ellos realizadas por la fórmula monomolecular (56):

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

siendo a la concentración original del agua oxigenada y x la cantidad descompuesta (medida por el oxígeno liberado) durante el tiempo t .

Si escribimos la ecuación de velocidad en la forma

$$K \cdot dt = \frac{dx}{a-x}$$

las variables se separan y la solución viene dada al integrar los dos miembros por la ecuación

$$K t = -\ln(a - x) + c = c - \ln(a - x)$$

siendo c la constante de integración. En el caso particular de ser $x = 0$ y $t = 0$, tendremos:

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

CLASIFICACION

No voy a detallarla. En dos grandes grupos encajan la mayoría de las conocidas: *hidrolasas* y *redoxasas*.

Las *hidrolasas* aceleran el momento de equilibrio de las reacciones hidrolíticas y, según el substrato, se clasifican en *esterasas*, *carbohidrasas*, *proteasas*, etc.

Las *redoxasas* o fermentos de óxido-reducción catalizan la deshidrogenación de los substratos orgánicos, transportando al hidrógeno de unas moléculas a otras y *liberando energía* de un modo fraccionado, *en pequeña moneda*, según la expresión de *Szent-Gyorgyi*. Estos fermentos intervienen en la oxidación biológica, en sus fases anaerobia y aerobia. En la fase primera intervienen las *dehidrogenasas*, las *codehidrasas*, la *flavinenzima*, los *citocromos b, c y a*, y en la fase final, en la que interviene el oxígeno, actúa el *fermento respiratorio*. En los vegetales intervienen, además de las *codehidrasas* y de la *flavinenzima*, las *polifenoloxidasas* y la *oxidasa-ascórbica* (56 bis).

En el grupo de los *fermentos de dislocación* encajan la *carboxilasa*, el complejo *zimasa* de la levadura y la *catalasa* (fermento interesante, pues existe en la mayoría de los seres vivos y está encargado de regular la producción e impedir la acumulación del hidroperóxido, y desempeña misión importante en la fotosíntesis de los vegetales verdes).

Hay otro grupo, el de los *fermentos fijadores de agua*, así: la *ureasa* no es una hidrolasa, pues la urea se transforma en carbonato amónico por simple fijación de dos moléculas de agua. La *alantoinasa*, estudiada por Fosse, fija agua sobre la alantoina y la transforma en ácido alantoico.

Hay un *fermento singular* que no encaja en los grupos citados, la *carbónico-anhidrasa*, descubierta por *Meldrum y Roughton*, en 1932, en los eritrocitos. Este fermento forma CO_2 a partir del bicarbonato sódico de la sangre venosa.

El *Dr. Villasante*, en el Instituto de Investigaciones Médicas del ilustre *profesor Jiménez Díaz*, practica valoraciones de este *fermento* siguiendo el *método manométrico de Meldrum y Roughton*; opera con sangre total (el suero inhibe al fermento), que luego diluye para hemolizar a los hematies. También está efectuando valoraciones de este fermento en jugo gástrico de aquilicos y con hipersecreción.

CATALASA

Oscar Loew, en 1901, descubrió la *catalasa*, fermento que cataliza la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno molecular.

Ejerce este catalizador papel primordial en los procesos respiratorios, regulando la producción e impidiendo la acumulación del hidroperóxido. También interviene en la función clorofílica.

En la mayor parte de las semillas el *poder germinativo* está íntimamente relacionado con su *actividad catalásica* (56).

La investigación de la *catalasa bacteriana* puede servir como ensayo preliminar para el *diagnóstico diferencial* de ciertas especies bacterianas del mismo grupo o de grupos diferentes (56).

Existe un método rápido de *análisis del suelo*, basado en la acción catalítica de las bacterias del suelo sobre el agua oxigenada (56)

La cifra de *catalasa de la leche* es un índice de su riqueza en bacterias y puede servir para dictaminar acerca de su *grado higiénico* (56).

La *acción catalásica* de la *sangre* viene condicionada por los eritrocitos, pues el fermento está adherido al estroma de los hematíes. La actividad catalásica de la hemoglobina es tan reducida, que puede ser despreciada.

Se llama *cifra de catalasa* de la sangre la cantidad de agua oxigenada descompuesta en un tiempo determinado por una cantidad

fija de sangre, y se llama *índice de catalasa* a la relación $\frac{\text{Cifra de catalasa}}{\text{Núm. de hematias}}$

Hay cambios en la *actividad catalásica* de la sangre en las *anemias*, aunque no siempre la cifra de catalasa es baja en las sangres pobres.

En la *anemia perniciosa*, según Niessen (57), hay *aumento de catalasa*, lo cual depende del *aumento de volumen de los hematias* y de la *riqueza en fermento* de los *elementos juveniles* (por esta razón en la sangre de los recién nacidos hay cifras altas de catalasa).

En diversas *enfermedades* se ha observado disminución del *contenido catalásico de la sangre*: *tuberculosis, diabetes, neumonía, tífus, nefritis, uremia, etc.*

Según Waldschmädts-Leitz, en el *hígado* hay aumento de catalasa en el *cáncer* (58).

Ottenstein y Pastinsky han investigado en *ratas con tumores* trasplantados, y concluyen que el *cáncer* provoca oscilación en el contenido de todos los fermentos y que sólo el *cociente catalasa/peroxidasa se mantiene constante* (59).

Ottenstein ha determinado la *cifra de catalasa en dializados de piel* y concluye que ofrece interés, puesto que es el *más fino indicador de los procesos de óxido-reducción en la piel*.

Marchionini y Ottenstein han investigado la *catalasa en líquido céfalo-raquídeo* (60).

Las *orinas piúricas*, por su riqueza en leucocitos, *descomponen intensamente al agua oxigenada*.

OXIDASA Y PEROXIDASA

La *oxidasa directa* (en el sentido de Chodat y Bach), *laccasa* de Yoshida y Bertrand, se investiga por la coloración azul que da a la emulsión obtenida con tintura de guayaco reciente, coloración azul con la bencidina, formación de púrpurogalina con el pirogalol, formación de quinhidrona al actuar sobre la hidroquinona, etc.

La *peroxidasa* da esas mismas reacciones, pero en presencia del agua oxigenada.

La *oxidasa* y *peroxidasa* sólo existen en los *leucocitos* de proge-

nie *mieloide*, y tiene interés en Hematología su *investigación* en las *extensiones de sangre* para diferenciar los leucocitos de la serie mieloide de los de la serie linfoide (que en algunos casos puede ser difícil diferenciar por los métodos de tinción corrientes).

Las *oxidases leucocitarias* se evidencian por la técnica de *Schultze* con α -naftol y *dimetilparafenilendiamina*, cuerpos que por la acción de la oxidasa se combinan para engendrar el azul de indofenol en gránulos azules localizados en el lugar correspondiente a las oxidases leucocitarias.

Para la investigación de las *peroxidases* puede seguirse la técnica de *Kreibich* o la de *Sato* (con bencidina y agua oxigenada).

El contenido en *oxidases leucocitarias* disminuye con la anestesia (con éter), observándose que cuanto más dura la anestesia más pobreza se observa en gránulos oxidásicos. Con las *inyecciones de histamina* también disminuyen las *oxidases leucocitarias* (*Habelmann*, 61).

La acción tóxica de la anestesia por el éter, y posiblemente por el cloroformo, sobre las *oxidases leucocitarias* es evidente y digna de tenerse en cuenta, pues desempeña, junto con las *peroxidases* y *catalasas*, funciones de importancia.

La investigación de *sangre en heces* como medio de descubrir *hemorragias ocultas* en estómago o intestinos se base en las *propiedades peroxidásicas de la hemoglobina* (por contener hierro y núcleos pirrólicos). Puede recurrirse a la prueba con *bencidina y agua oxigenada*, pues la bencidina pasa a *difenoquinondiimina*, que reaccionando con más bencidina se transforma en un cuerpo de coloración azul. No está de más recordar que esta prueba debe practicarse sometiendo al enfermo a una *dieta especial, sin carne* (que contiene *sangre*) y sin ciertos alimentos vegetales (que pueden contener *peroxidases*), y comprobando que el enfermo no tiene *hemorragias* en las *encías* (que pueden producirse por el simple cepillado de dientes) ni *hemorroides*.

Cuando se investiga *sangre en orina* con bencidina o con emulsión de tintura de guayaco en presencia de H_2O_2 es necesario tener presente la posibilidad de que existan *leucocitos*, cuyas *peroxidases* den positivas las reacciones empleadas para explorar la presencia de *sangre*, y por ello es indispensable *hervir previamente la orina*, pues a esa temperatura se destruyen las *peroxidases leucocitarias*, conservándose, en cambio, intacta la *hemoglobina*, que sigue dando + aquellas reacciones. Idénticas precauciones deben adoptarse al investigar *sangre en jugo gástrico y en heces*.

La *peroxidasa de la leche de vaca* se destruye a 70-80°. La investigación de la peroxidasa en la leche (ensayos con la emulsión de tintura de guayaco, con el guayacol, con la dimetilparafenilendiamina, etcétera, en presencia del H_2O_2) permite diagnosticar si una *leche* está *cruda* o averiguar si no ha sido sometida a temperaturas superiores a la de destrucción de la *peroxidasa*, siempre, claro está, que

no se le haya adicionado después del tratamiento térmico preparados con *peroxidasa* activa, como emulsión de chufas o de soja, o simplemente una papilla hecha triturando patatas con agua.

La leche procedente de glándula inflamada, *mamitis*, que es tan frecuente en nuestras vacas lecheras, por su riqueza en *polinucleares*, da fuertemente positivas las reacciones de la *peroxidasa*.

Raudnitz demostró la existencia de *peroxidasa* en el calostro de mujer y lo relacionó con la existencia de *polinucleares*, afirmando que dicho fermento desaparece cuando el calostro es sustituido por la leche hacia el séptimo u octavo día después del parto.

El profesor *Marfan* demostró que en el 8 % de los casos la leche de mujer, varios meses después del parto, daba también positivas las reacciones de la *peroxidasa*, aunque menos intensa que el calostro. Esta *peroxidasa* sería debida en la leche normal a la presencia de pequeño número de leucocitos o de restos de *polinucleares*. El que en algunas mujeres sea constantemente negativa dicha reacción se debe a una insuficiencia en la secreción láctea—por eso es esta contingencia más frecuente al final de la crianza—o a que se trata de madres fatigadas o enfermas (62).

Como el retorno de la menstruación provoca en la leche de algunas mujeres una reacción calostrada, se comprende que en esos casos la reacción de *peroxidasa* en la leche sea fuertemente positiva, y por eso cuando un niño criado a pecho presenta *fenómenos dispépticos*, más o menos graves, se examina la leche de la nodriza, y si da *peroxidasa* fuertemente positiva, se trata de un retorno a la menstruación, período durante el cual la leche es posible contenga sustancias tóxicas, que provocan aquellos trastornos.

El *gonococo* y el *meningococo* poseen *oxidasa*s, cuya investigación puede ayudarnos en el diagnóstico clínico de dichos gérmenes. Se vierte sobre la placa en que se han desarrollado las colonias una disolución de clorhidrato de tetrametilparafenilendiamina al 1 % (preferible al dimetil, pues da reacciones más rápidas y no mata tan precozmente a los gérmenes), se da un ligero movimiento y se escurre el exceso. Las colonias purpúreas (*reveladoras de oxidasa*), si se han aislado de un *espermocultivo*, son de *Gonos* si al ser repicadas y observadas están formados por *Diplos-gram-negativos*. Si las colonias que dan *oxidasa* positiva se han aislado de una siembra de líquido céfalo-raquídeo, son de *Meningococos* si aparecen formadas por *Diplos-gram-negativos*.

Persico, en su tesis doctoral, afirma que el *gonococo* contiene, además de *oxidasa*, *peroxidasa*, y recomienda impregnar un papel de filtro en disolución de bencidina que contenga acético y agua oxigenada y utilizarlo como excelente piedra de toque para identificar las colonias sospechosas de *gonos*, desplazando sobre dicho papel el asa cargada del material, pues aparecerá inmediatamente una coloración verde (63).

DIAMINO-OXIDASA

Se trata de un fermento que oxida cuerpos que poseen dos grupos básicos (por ejemplo, *cadaverina*, *putrescina*). Se halla en la *placenta*, *esperma*, *mucosa intestinal*, *higado*, *riñón*, y se ha observado que durante el *embarazo*, y a partir ya desde las primeras semanas, hay un aumento elevado de *diamino-oxidasa*, que puede servir para el *diagnóstico precoz del embarazo*.

Con gran constancia en el *suero de embarazadas* se revela la *presencia* de *diamino-oxidasa*, y su actividad se deduce del consumo de oxígeno en la oxidación de la *cadaverina* o indirectamente por la valoración de amoníaco liberado que se extrae por destilación y se determina colorimétricamente (64).

LIPASAS

Eberlé, en 1834, observó que el *jugo pancreático* posee la propiedad de emulsionar las grasas.

En 1855, *Claude Bernard* demostró que los aceites o grasas neutras en general, agitados con jugo pancreático, dan rápidamente emulsión, cuya acidez aumenta poco a poco por liberación de ácidos grasos.

Schützberg, en 1877, fué el primero en atribuir a un *fermento* la *hidrólisis* de las grasas, y *Green*, en 1889, extrajo la *lipasa* de las semillas del *ricino* en germinación.

En 1896, *Hanriot* halló *lipasa* en la *sangre*, y en 1906, *Arthus* lo confirmó.

Las semillas oleaginosas son ricas en *lipasa*, especialmente la de *ricino*, que se utiliza en la industria para la *saponificación de grasas*.

La acidificación y enranciamiento de las semillas oleaginosas y de los aceites está catalizada por la intervención de *lipasas*.

Quagliariello y *Scoz* han hallado en el tejido adiposo *lipasa*, que desdobra glicéridos de ácidos grasos de elevado peso molecular, y, según ellos, también se pueden extraer del tejido adiposo *fermentos* que *deshidrogenan* (65) al ácido *estéarico* (*), pero no a sus ésteres. Estiman que la movilización de la grasa va precedida de *hidrólisis* de grasas neutras y *desaturación* de ácidos grasos liberados para hacerlos más solubles y difusibles, y consideran posible que los mismos procesos tengan lugar en los fenómenos reversibles de depósito de grasas.

(*) El Dr. Grande Covián ha determinado la *estéarico-deshidrogenasa* y la *palmítico-deshidrogenasa* en las semillas de *Agrostemma coelirosa* y *Papaver somniferum* (66).

Virtanen y Suomalainen han observado interesantes transformaciones de *lipasa exógena* en el organismo animal. Inyectan *lipasa de páncreas* de cerdo en vena a conejo y observan un aumento proporcional en la *esterasa hepática*. La *lipasa* así almacenada en el hígado es, sin embargo, verdadera *esterasa hepática*, y no es inhibida por el atoxil (*) y actúa débilmente sobre el aceite de oliva. La especificidad enzimática en el organismo se adapta al medio (67).

En enfermedades de los diferentes órganos que contienen *lipasa* se observa en el suero sanguíneo la presencia de las *lipasas* correspondientes a esos órganos, lo que demuestra que en las alteraciones funcionales hay derrame de sus *lipasas* al torrente circulatorio.

La posibilidad de diferenciar *lipasas* de órganos se basa en su especial modo de responder a la acción de la *quinina* y del *atoxil* (**).

Rona y colaboradores dan la siguiente *clasificación de las lipasas*:

Procedencia	Atoxil	Quinina
Suero.	Sensible.	Sensible.
Hígado.	Sensible.	Resistente.
Riñón.	Sensible.	Resistente.
Páncreas.	Resistente.	Sensible.
Tiroides.	Resistente.	Resistente.

Fiessinger y Gajdos consideran a la *suero-lipasa* como *hepatolipasa*, basándose en que en casi todas las enfermedades con insuficiencia hepática hay disminución de la *sero-lipasa* (en 30 casos investigados de *cirrosis hepática* observaron *disminución* en la *sero-lipasa* en 26) y que el estado general mejora paralelamente al aumento de la *sero-lipasa*. En la intoxicación por el fósforo también hay disminución de la *lipasa hepática* y de la *sero-lipasa*.

Es muy interesante el hecho de que la inyección de *lipasa hepática* en el hígado aumenta la resistencia de los animales a la acción tóxica del fósforo.

Fiessinger ha demostrado los buenos efectos de la inyección de *lipasa hepática* en el tratamiento de las *cirrosis* (69).

Polack considera de un gran valor para la *prueba funcional del hígado* la determinación en el suero de la *lipasa quinín-resistente*, y *Denstadt* estima que dicha prueba es de mayor valor que la reacción de *Takata*.

(*) *Waldschmidt Leitz*, en la pág. 40 del An. Rev. of Biochemistry, 1934, dice así: «The lipase thus stored up in the liver is, however, true liver esterase, it acts for exemple very stightly on olive oil and is not inhibited by atoxil».

(**) Según *H. Simon*, los *hematies* contienen *lipasa* activa, resistente a la *quinina* y al *atoxil*, y por eso en los *procesos hemolíticos* se observa en la sangre la presencia de *lipasa quinín y atoxil-resistente*.

Según *Meyer y Jahr*, la presencia en el suero de una *quinín-resistente lipasa* indica *destrucción de células hepáticas*, aunque no siempre existe paralelismo entre la cantidad de *sero-lipasa* y el grado de afección del hígado.

Para *Friess y Hallay*, en enfermedades agudas y difusas de las células hepáticas, en la ictericia catarral, ictericia salvarsánica, en la hepatitis sifilítica, en la gúmma hepática, con gran regularidad se halla en el suero *lipasa quinín-resistente*, mientras que en la *cirrosis hepática*, en el éxtasis del hígado (*stauungsleber*) y en el *carcinoma hepático*, esas lipasas no siempre se encuentran (70).

Gottron, Petow y Schreiber, en *xantomas*, junto con *hipercolesterinemia alta*, observan *disminución de lipasa* y presencia de *quinín-resistente lipasa* en la sangre, mientras que las demás pruebas funcionales del hígado eran normales.

De todos estos trabajos puede deducirse que en los trastornos de la función hepática puede confirmarse la presencia en el suero de una *lipasa quinín-resistente*.

En el cuadro de *Rona* vemos que también la *renolipasa* y la *tiroidolipasa* son *quinín-resistentes*, y también lo son la *pulmolipasa* y la *suprarrenolipasa*, y por eso la presencia de *lipasa quinín-resistente* en el suero no siempre podrá atribuirse a alteraciones de la célula hepática. *Petow y Schreiber* hallaron en el suero la presencia de *quinín-resistente lipasa*, también en *glomerulonefritis graves*, *nefrosis* y *esclerosis renal*, y *Jorns* (72) la halló en *adisonianos* (*).

En las *intoxicaciones por el alcohol* y por el *fósforo* la presencia en el suero de *lipasa quinín-resistente* debe considerarse como reflejo de la penetración de *ácidos biliares* en la sangre, los cuales incrementan la *quinín-resistencia* de la *lipasa* de la sangre. *Avellone y di Macco* opinan que en las enfermedades hepáticas es posible que ocurra también eso.

En el suero normal no existe *lipasa atoxil-resistente*; y como la *lipasa pancreática* lo es *atoxil-resistente*, su presencia en la sangre indicará *alteraciones del páncreas*, aunque un resultado negativo no permite inferir la no existencia de enfermedad del páncreas.

En *agudas necrosis del páncreas* y en *pancreatitis crónicas* se observa *fuerte aumento de lipasa atoxil-resistente* en la sangre.

D'Ignazio ha determinado en enfermos *diabéticos* la presencia de *atoxil-resistente lipasa* (73).

Bernhard ha observado la presencia de *lipasa atoxil-resistente* en los *tejidos cancerosos* y en el suero de esos enfermos, y que después de la operación la *serolipasa* se normaliza, y si no ocurre así es que aún hay restos del tejido canceroso.

(*) *Jorns* ha descubierto que *lipasa suprarrenal* es sensible al hidrato de cloral y que no lo es la *lipasa normal del suero*, ni la *hepato-lipasa*, y que también hay *lipasa sensible al hidrato de cloral* en el suero de enfermos de *hipernefrosis*.

Numerosos trabajos se han publicado sobre la *tuberculosis* y *actividad lipolítica del suero*. Clerc, en 1902, fué de los primeros en manifestar que *disminuye la actividad lipásica del suero de tuberculosos*, hecho que ha sido confirmado por diferentes investigadores. En procesos tuberculosos benignos se observan sólo pequeñas modificaciones en el título de *lipasa* del suero (normal o ligeramente elevada). *Cifras altas de lipasa se observan en tuberculosis graves*.

Para Zorn, la disminución del *título de lipasa* puede tomarse como signo desfavorable en el proceso tuberculoso, aunque ha observado casos graves con *lipasa* normal (75).

Según Kanócz, el *proceso tuberculoso* en animales infectados con bacilos *mejora por inyección de lipasa* (76). Si esto fuera cierto sería prueba concluyente de que las envolturas del bacilo habían sido atacadas por la *lipasa*. Estas experiencias, han llevado a algunos al *ensayo terapéutico de lipasa* para el tratamiento de la tuberculosis.

Bloch fué el primero en investigar la *lipasa de la orina*, y demostró que era *quininresistente* y de *procedencia renal*. En las enfermedades del riñón aumenta la *lipasa urinaria*.

Según Zorn, la presencia de *lipasa en la orina* de adultos debe interpretarse en general como patológica. En la *tuberculosis* la aparición de *lipasa* en cantidad grande en la orina es considerada como de pronóstico desfavorable, y en otras enfermedades infecciosas la desaparición de *lipasa* en la orina puede tomarse como signo de mejoría o de curación.

La *leche de mujer* contiene *lipasa*, que es activada por el jugo gástrico y no se inactiva por el atoxil o por la quinina; en cambio, los leches de vaca, cabra, perra y coneja no contienen *lipasa*.

COLINESTERASA

Gauthelet señaló el carácter hormonal de la *colina*, cuyo grupo alcoholico se esterifica fácilmente en el organismo, principalmente por el acético, formándose la *acetilcolina*; tanto ésta como la *colina* presiden los movimientos intestinales.

La *acetilcolina* se destruye (inactivándose) rápidamente por la acción de la *colinesterasa*, que le desdobla en *colina* y acético. Este fermento se encuentra en la *sangre*, *cerebro*, *hígado*, etc.

La *fisostigmina* o *eserina*, y también la *prostigmina* (*), inhiben a la *colinesterasa*, y por eso la inyección preliminar de *eserina* aumenta el efecto farmacológico de los ésteres de la *colina* en los casos que se han ensayado.

(*) La *prostigmina* se utiliza para tratar satisfactoriamente la *astenia muscular*. Vemos en este caso relación evidente entre su acción terapéutica y la acción inhibitrice sobre la *colinesterasa*.

La *colinesterasa* protege al organismo de la intoxicación por la acetilcolina, que es considerada como el transmisor químico del impulso nervioso. Dale llama *cholinergic nerves* a los que como el vago recurren a la *acetilcolina* o sustancia similar para transmitir sus efectos, y *adrenergic nerves* a aquellos cuyos efectos se transmiten por la liberación de la *adrenalina* o sustancia similar. El estímulo de los primeros determina la aparición de acetilcolina en el líquido que los baña, hecho descubierto precisamente basándose en que *la eserina protege a la acetilcolina de su destrucción por la colinesterasa* (77).

Verebély (78) ha observado disminución de *colinesterasa* en sangre después de pérdidas de sangre. Y *Antopol, Tuchman* y *Chifrin* han observado que disminuye dicho fermento en *cirrosis hepática, hepatitis, fiebre, anemia* y *poliartritis*, y aumenta en el *hipertiroidismo* y diabetes grave no tratadas (79).

El Dr. Villasante (en el Instituto de Investigaciones Médicas) hace determinaciones de *colinesterasa* en *vasos Warburg*, modelo de respiración, utiliza como substrato acetilcolina Roche al 0,125 % y opera a un pH-8; el acético liberado actúa sobre líquido Ringer, y el CO₂ producido lo mide con el manómetro del Warburg. Ha practicado múltiples determinaciones en sangres de personas normales y alérgicos (asmáticos y jaquecosos) y en sangre de conejos sanos y distróficos.

Según *Zeller* (80), tanto la *acetilcolina* como la *colinesterasa* están en estrecha dependencia con la función sexual. En perros tratados con *foliculina* asciende la colina en el útero desde o hasta 0,4 mgs. %, y frente a esa inundación de acetilcolina reacciona el organismo aumentando su contenido en *colinesterasa* en hígado. Si se castra a una rata hembra disminuye la *colinesterasa*, y cuando a ese animal se administra *estradiol* aumenta, alcanzando los límites normales o más elevados.

En el embarazo, donde la formación de *foliculina* es grande, sufre aumento la cifra de *acetilcolina* y de *colinesterasa* y desciende después del parto.

En el climaterio la *colinesterasa* es activa y la *acetilcolina* disminuye frente al déficit de hormona folicular, apareciendo trastornos circulatorios que desaparecen, bien con la administración de *acetilcolina* o de *foliculina*.

FOSFATASAS

Son los fermentos que catalizan la hidrólisis de los ésteres fosfóricos. Son los agentes de movilización del ion fosfórico, condicionando así todo el metabolismo fosforado, del que a su vez dependen otros procesos metabólicos (por ejemplo, el metabolismo de los glúcidos, de los lípidos y de los prótidos). Desempeñan papel importante en la osteo-

génesis y en la *osteolisis*, en la *absorción intestinal* y en la *eliminación renal* de los compuestos fosforados.

El primer período en el estudio de las *fosfatasa*s fué inaugurado por los investigadores japoneses *Suzuki*, *Yoshimura* y *Takaishi*, en 1907, localizando dicho fermento en diferentes tejidos (81).

El segundo período fué inaugurado, hacia 1920, por *Robison* y *Kay*, que se esforzaron en preparar *fosfatasa*s de la mayor pureza posible y precisaron su modo de acción y sus caracteres.

En todas las células (vegetales o animales, bacterias, mohos) existen *fosfatasa*s capaces de hidrolizar los ésteres fosfóricos. En los mamíferos los tejidos más ricos son: los *huesos* de los animales jóvenes, el *riñón* y la *mucosa intestinal*. En los vegetales existe en las *semillas*, *hojas*, *tubérculos*, *raíces*, *granos de polen*, etc., siendo especialmente *ricas en fosfatasa* las *levaduras*, pues dichos fermentos presiden a la formación y a la hidrólisis de los ésteres hexosafosfóricos en la fermentación alcohólica de los glúcidos.

No existe una sola *fosfatasa*, sino un número variado de estos fermentos, cuya especificidad puede ser fijada con mayor o menor rigor.

A continuación doy la *clasificación general de las fosfatasa*s de *Folley* y *Kay* (82):

Clase de fermentos	Substrato hidrolizado
A. Fosfomonoesterasas.	Todos los monoésteres del ortofosfórico (glicerofosfatos, monofenil y monometilfosfatos. etc.; nucleótidos).
B. Fosfodiesterasas.	Todos los diésteres del ortofosfórico.
C. Pirofosfatasa.	Sales y diésteres simétricos del ácido pirofosfórico.
D. Metafosfatasa (*).	Sales del ácido metafosfórico.
E. Fosfoamidasa.	Amidas del ácido fosfórico (fosfocreatina).
F. Otras fosfatasa:	Actúan sobre un solo substrato.
Lecitinasa.	Lecitinas.
Fitasa.	Fitina.
Adenilpirofosfatasa.	Adenilpirofosfatos.
Hexosadifosfatasa.	Hexosadifosfatos.

En el grupo A de *fosfatasa*s distinguen *Jenner* y *Kay* cuatro subgrupos, atendiendo a su pH óptimo, velocidad relativa de su acción sobre el alfa o betaglicerofosfato y por la acción que sobre ellas ejercen los iones de Mg (83).

(*) La *metafosfatasa* es el único fermento capaz de actuar sobre un substrato inorgánico (*metafosfatos*) que no existe en las células.

Subgrupo	Localización.	pH óptimo	Velocidad relativa de hidrólisis del α o del β glicerofosfato	Efecto de los iones Mg
A _I	Hueso, riñón, intestino, glándula mamaria, plasma, leucocitos.	9,10	$\beta > \alpha$	Activador.
A _{II}	Salvado de arroz, bazo, hígado, páncreas, riñón.	4,5	$\beta > \alpha$	No activador.
A _{III}	Takadiastasa del <i>A. oryzae</i> .	3,4	$\beta > \alpha$	Activador.
A _{IV}	Hepatitis, levadura.	6	$\alpha > \beta$	Activador.

Todas las *fosfatasa*s no trabajan al mismo pH. Hay un subgrupo dentro del A a' cual Kay le designa con el nombre de A₁, cuyo pH óptimo es, en medio alcalino, hacia 9, y otros tres subgrupos: A₂, A₃, A₄, cuyo pH óptimo es inferior a '7; es decir, la acidez del medio les favorece.

Las del tipo A₁ rápidamente se inactivan a 37° en las proximidades del pH óptimo y en ausencia del substrato, pero en presencia de éste la inactivación es más lenta. Según Belfanti, la *fosfomonoesterasa* A₁ del hígado, de los huesos y del riñón se inactiva por ligera acidificación del medio. La *fosfomonoesterasa* A₃, de la Takadiástisa del *Aspergillus oryzae*, estudiada por Akamatsu, tiene un pH óptimo de 3,4, y la *fosfomonoesterasa* A₄, de los hematíes de los mamíferos, estudiada por el profesor Roche, tiene un pH óptimo de 6,0 a 6,5 y actúa con más intensidad y rapidez sobre los alfa-glicerofosfatos que sobre los beta-glicerofosfatos; en cambio, la A₁ de los huesos actúa mejor sobre los beta que sobre los alfa-glicerofosfatos.

En 1927, Erdtmann descubrió la influencia favorable de los iones de Mg, a débil concentración, sobre las *fosfatasa*s, y en 1932 fué estudiada esta acción por Kay. La A₁ y la A_{IV} son activadas, pero no la A₂.

Robison publicó en 1923 un trabajo interesante, en el que dió cuenta de la existencia en los huesos de una *fosfatasa* que participa en la *osificación*. Demostró que huesos de jóvenes ratas en crecimiento (en especial la región epifisaria de los huesos conteniendo el cartilago de conjugación), colocados en disolución de hexosamonofosfato, desdoblán al éster en hexosa y ácido fosfórico, y que utilizando como substrato de dicha acción enzimática glucosa monofosfato bórico se produce un precipitado de fosfato bórico. Estas experiencias le hicieron ver el papel fisiológico de la *fosfatasa* en la mineralización de los huesos (84).

La *fosfatasa* de los huesos pertenece al grupo A₁ de Kay.

El profesor Lora Tamayo ha modificado la técnica de Robison de

preparación de la fosfatasa de los huesos, logrando obtener una enzima de mayor actividad (84 bis).

El estudio histoquímico de la repartición de la *fosfatasa* en epífisis de los huesos largos de mamíferos (conejo y hombre) iniciado por *Robison* fué proseguido por *Policard, Péhu, Roche* y *Boucaumont*, y ha permitido comprobar que existe *paralelismo* estrecho entre *intensidad de la calcificación* y *contenido en fosfatasa* de las diversas formaciones histológicas contenidas en esa región de los huesos largos en crecimiento. El cartílago hialino que no se calcifica no contiene *fosfatasa*, y el cartílago de conjunción es rico, y más lo es aún la metáfisis subyacente, y conservan intacto "in vitro" el mecanismo apto para realizar la calcificación.

El plasma aporta a los humores iones de Ca^{++} y en menor cantidad iones PO_4 , pero además ésteres fosfóricos que encierran una proporción de 0,5 a 1 mg. de P en 100 c. c. La *fosfatasa* de los huesos es la que regula su hidrólisis, con lo cual determina un enriquecimiento de los iones PO_4 , llegando un momento en que se sobrepasa el producto de solubilidad del fosfato tricálcico, con lo que se provoca la precipitación de esta sal.

En el hombre la *calcificación de la rótula* no comienza antes del tercer año de su vida y se prosigue lentamente hasta la pubertad. Antes de la aparición de este centro de osificación no existe *fosfatasa* en la *rótula*, y en cambio, este hueso es rico en enzima cuando está en plena osificación.

No se puede dudar que la *fosfatasa* es un factor de aceleración de la *calcificación de los huesos*, aunque éstos pueden evolucionar fuera de toda actividad enzimática importante.

Cambios muy interesantes tienen lugar en la *actividad fosfatásica de la sangre* en diversas enfermedades, especialmente en enfermedades de los huesos generalizadas: *osteitis deformans, osteitis fibrosa generalizada, osteomalacia* y *raquitismo*. En ellas se observa *aumento de la actividad fosfatásica del plasma*, y se eleva en ocasiones a unas veinte veces sobre la cifra normal (*).

El doctor *Grande Covián*, que ha investigado *fosfatasas* en raquíticos, ha temido la amabilidad de comunicarme lo que sigue: "En la encuesta sobre el estado nutritivo de la población de Vallecas, sólo he visto marcado aumento de *fosfatasa* en tres niños, todos con raquitismo en actividad, entre más de un centenar de observaciones."

El doctor *Eloy López*, en el Instituto de Investigaciones Médicas del profesor Jiménez Díaz, practica determinaciones de *fosfatasa* en sueros de reumáticos; sigue la técnica de Bodansky, con la modificación de utilizar el colorímetro fotoeléctrico Leitz-Mass.

(*) En los *huesos raquíticos* existe exceso de *fosfatasa*, que se derrama a la sangre. La carencia de *vitamina D* va acompañada de alta cifra de *fosfatasa* en suero. La *vitamina D* es considerada por algunos como activador de la *fosfatasa*.

La *bilis* es una *secreción rica en fosfatasa*, lo que explica el que la *fosfatasemia aumenta en las ictericias por retención* (diferencia con las ictericias hemolíticas). Las afecciones hepáticas es posible que determinen una mala absorción intestinal de fosfatos y sales de calcio por eliminación biliar defectuosa; si esto fuese comprobado—afirma Filippi—estaría indicada una medicación rica en *fosfatasas*.

La sangre de *cancerosos* acusa *gran actividad fosfatásica*, que marcha paralela con el progreso del tumor. Si persiste la *cifra alta de fosfatasa en sangre* puede deducirse que haya *metástasis*, y entonces estaría contraindicada la intervención (85).

Por la *orina* se eliminan *fosfatasas*. Es posible y probable que las *fosfatasas* alimenticias (que no son digeridas por la *pepsina* ni por la *pancreatina*) sean absorbidas, pues la eliminación de *fosfatasas* por la orina aumenta después de las comidas.

La orina normal contiene *fosfatasa* (Dmochowski-86), siendo la orina de la noche más rica en *fosfatasa* en el hombre a causa de mezclarse con *líquido prostático*. Wolbergs halló relación entre el metabolismo de los hidratos de carbono y la *fosfatasa urinaria* (87), observando que con el recargo de *insulina* aumenta dicha *fosfatasa* y también en la hipoglucemia. Para Brugsch y Hortels la *insulina es coenzima de la fosfatasa* (88).

Según Kulscher, la *próstata* es el *órgano más rico en fosfatasa*, y por eso el *líquido prostático* da cifras muy altas de *fosfatasa* (89).

El investigador japonés Imagawa ha investigado *fosfatasas* en *esputos de tuberculosos*; y comprobando que una *elevada cifra de fosfatasa* puede considerarse como signo de favorable pronóstico, y que a *mayor actividad fosfatásica menor es el número de bacilos del esputo*.

Aunque la *investigación de fosfatasa* no es sencilla para los usos corrientes de la clínica, no obstante, ofrece gran interés, pues permite deducir la *marcha de diversos procesos patológicos*.

La *leche cruda* contiene *fosfatasa*, que se destruye por pasteurización con más lentitud que los organismos patógenos más resistentes al calor que puedan presentarse en la leche, de tal forma que la *ausencia total de la fosfatasa en una muestra de leche pasteurizada es una buena prueba de que los microbios patógenos han sido destruidos*. También se aplica este criterio a la pasteurización de la crema y mantequilla (90).

LECITINASA

La *hidrólisis de la lecitina* no es obra de un solo fermento, sino de un *complejo de fermentos*.

Se admite, que la primera etapa en la degradación de la lecitina consiste en la separación de una molécula de ácido graso no saturado y liberación de la *lisocitina* por la acción de una *fosfolipasa*, que únicamente actúa sobre los fosfolípidos, siendo la *lipasa* y la *butirasa*

incapaces de realizar dicha acción. Un segundo fermento entra en la constitución de la *lecitinasa*, pero ya no es fermento específico de la lecitina, pues se trata de un *diesterasa* que ataca a la ligadura del fosfórico con la colina, o la del fosfórico con el glicerol, liberando colina o glicerol, y un monoéster fosfórico sobre el cual actuará una *monoesterasa*, para dejar en libertad el fosfórico y el alcohol con el cual está esterificado.

El veneno de la cobra (*Naja tripudians Merr*) y el de la víbora (*Vipera aspis Merr*) contienen *fosfolipasa* y a expensas de la lecitina forman la *lisocitina*, sustancia dotada de alto poder hemolítico (91).

Es precisamente a la saponificación parcial de la lecitina que se atribuye la propiedad hemolítica de dicha sustancia una vez que es mezclada con el veneno de cobra.

La acción lítica de la *lisocitina* va precedida de su unión inmediata con el colesterol hemático, molécula a molécula, formándose un complejo indiferente (*lisocitina + colesterol*) desprovisto de acción hemolítica, pero que tiene la particularidad de retener el agua con gran energía. De esta forma, al unirse la lisocitina con la colessterina de los hematias, aumenta el coeficiente de imbibición de éstos en proporción tal, que estalla la membrana celular difundiéndose el contenido celular.

La *lisocitina* no es un tóxico exclusivamente hemático; actúa sobre la mayor parte de las células, destruyéndolas (leucocitos y células de diferentes tejidos), y si la dosis empleada es suficiente, afirma *Ledebt*, las disuelve totalmente como a los hematias.

La *lisocitina* obtenida con la *fosfolipasa* del veneno de cobra posee un poder citolítico muy intenso frente al *estreptococo*, al cual lo hipertrofia y luego disocia en zonas netamente diferenciadas. En los cocos así lisados quedan unas *granulaciones resistentes* (fuertemente coloreables por la fuchina) que *Pascal* se cree autorizado a sospechar se trata de granulaciones nucleares, pues *Rousseau* ha observado que los núcleos de los leucocitos polinucleares resisten a la acción de la *lisocitina*, en tanto que el resto de la célula es lisado (92).

AMILASAS

Las *amilasas* intervienen en la movilización del almidón y del glucógeno.

Se admite que la *amilasa salivar* puede ejercer cierta actividad en el estómago cuando los alimentos ingeridos no son inmediatamente mezclados con el jugo gástrico, y que esto ocurre también con la *amilasa de la malta* y con la *pancreática* cuando se emplean con finalidad terapéutica; pero la reacción del contenido gástrico en la mayor parte de los casos inhibe a esos fermentos.

La *takadiastasa*, obtenida a partir del micelio del *Aspergillus niger*, tiene un pH óptimo más bajo que aquellas *amilasas*, y por eso es pre-

ferible a la *amilasa* de la *malta* y ambas son superiores a la *amilasa pancreática*.

Extractos de malta ricos en *amilasa* (diamalt) se utilizan en la panificación (pues abrevian la fermentación panaria, la hacen más uniforme y con ello se consigue economizar levadura) y en la preparación de alimentos: bizcochos, harinas de cereales (especialmente de avena) malteadas, etc., pues por su contenido en fermento descomponen más o menos profundamente al almidón. En la industria textil se utilizan los *extractos de malta* para quitar apresto a los tejidos.

La *investigación* de la *amilasa* en *sangre*, *orina* y *heces* ofrece gran interés clínico. Ya en 1910, *Wohlgemuth* señaló que el aumento de *diastasa pancreática* en la orina y sangre debía considerarse como signo revelador de la alteración de la secreción externa del páncreas.

Se llama *unidad Wohlgemuth* a la cantidad de fermento que hidroliza a 1 mg. de almidón a 38° y actuando durante treinta minutos. Las U. W. se expresan por c. c. de orina o de sangre, o de líquido problema (93).

Wohlgemuth no tenía en cuenta el pH del medio, y fué *Baumann* quien vió la necesidad de ajustar dicho pH con disolución tampón de fosfatos, pues utilizándose la *prueba de Wohlgemuth* para diagnosticar *pancreatitis agudas*, en las que la carencia alimenticia favorece los procesos de *acidosis*, que determinan acidificación de la orina, la cual adquiere un pH poco favorable a la investigación de la *amilasa pancreática*. Es decir, que si no ajustamos previamente el pH de la orina al investigar la *amilasa* nos exponemos a sacar conclusiones diagnósticas erróneas, pues puede suceder que exista *amilasa* en la orina y no se nos revela al no colocarla al pH que más le conviene, que es de 6,8, según *Waldschmidt-Leitz*, para la *amilasa pancreática* (94).

La actividad de la *amilasa* en la orina queda ya reducida a la mitad a un pH 5,7, y a $\frac{1}{4}$, a un pH de 5,4.

Más difícil es influir en la riqueza de Cl' y fosfatos de la orina, los cuales influyen también en la actividad de la *amilasa urinaria*. Las variaciones de Cl' y de PO₄''' pueden explicarnos algunos resultados discordantes observados, a pesar del ajuste previo del pH.

La *amilasa* más importante de nuestro organismo es la del páncreas, la cual se excreta en forma activa al intestino, en cantidad de 320 a 960 U. W. por c. c. *Henning* y *Bach* opinan que normalmente no hay reabsorción de esa *amilasa* por vía intestinal, pero *Rostock* manifiesta que se reabsorbe y llega así a la sangre.

De la glándula va a la sangre directamente una cantidad equivalente a 8-32 U. W. por c. c. La sangre la lleva al riñón, y en la orina sale la *amilasa* concentrada hasta 64 U. W. por c. c.

Cuando hay *alteraciones del páncreas* hay derrame del fermento (*fermentengleisung*) a la sangre, y en consecuencia la *cifra de amila-*

sa sanguínea aumenta notablemente, pero mucho más aún la cifra de amilasa urinaria.

Según *Baumann*, en *necrosis agudas del páncreas*, la *amilasa urinaria* puede elevarse hasta 2.000 y 4.000 U. W., y por ello se puede establecer rápidamente el diagnóstico, pues se trata de una enfermedad de curso rápido y mortal. Lo mismo se observa en *pancreatitis agudas* (que sólo es diferencia gradual de la necrosis), en las que los daños del parénquima aparecen repentinamente, y por eso hay que ponerse en guardia cuando se observan pequeños aumentos de amilasa en la orina.

Bouitroux y *Branisteanu* manifiestan que el aumento de *amilasa urinaria* puede proporcionar elemento diagnóstico en todas las afecciones pancreáticas, pero que *pierde toda significación si coincide con ellas una afección de las glándulas parótidas*. Ellos han provocado pancreatitis hemorrágica en perros y han comprobado un aumento de *amilasa* en la sangre y en la orina (95).

En afecciones de los conductos biliares, *colecistiasis* y *colecistitis*, hay también aumento en la cifra de *amilasa*, que después de la operación vuelve a los valores normales. Hay también aumento, aunque no con tanta intensidad ni con la misma frecuencia que en las *colecistopatías*, en la *úlcera ventricular* y en la *duodenal*, especialmente cuando el páncreas penetra a través de la úlcera por la pared posterior del estómago. En *duodenitis* y *gastroenteritis* puede también haber aumento de *amilasa*. En general, la *amilasuria* está ligada con *enfermedades del páncreas*.

La disminución de *actividad amilásica* no es tan importante como la confirmación de un aumento de actividad. Según *Schmerel*, hay disminución del fermento en la *diabetes mellitus*, y según *Gray* y *Somogyi*, también hay disminución en las *graves sepsis puerperales*, *neumonías* e *ictericia*.

El aumento de fermento en la orina no va siempre acompañado de un aumento proporcional en la sangre. La cifra normal en sangre es de 32 U. W. por c. c. En la *amilasa* de la sangre, además de la *amilasa pancreática*, participan la *amilasa salivar* y la *hepato-amilasa*, aunque la fuente primordial es la *amilasa pancreática*, pues la ablación de este órgano determina disminución grande de *amilasa* en la sangre.

En los trastornos del páncreas también se observan cifras elevadas de *amilasa en sangre*, aunque nunca se alcanzan las cifras que en la orina. *Baumann*, en *pancreatitis aguda*, señala en el plasma sanguíneo cifras de 128 U. W. por c. c., rara vez de 250 U. W., y en general entre 6 y 12 veces la cifra normal, en tanto que en la orina de esos enfermos y también en el exudado peritoneal se alcanzan cifras de 2.000 a 4.000 U. W.

Brinck y *Rodríguez Olleros* (96) han hecho múltiples determinaciones de *amilasa en sangre* siguiendo la técnica de *Berta Ottenstein*,

que utiliza *glicógeno* de hígado de caballo como sustrato. Han hallado casi constantemente *amilasa* en *colecistíticos*, aun sin acompañarse de otros signos que hicieran sospechar lesión pancreática.

En la mayor parte de *enfermedades agudas o crónicas del páncreas* se observa *derrame de fermento a la sangre*, y en las *cirrosis* de páncreas se hallan valores bajos, mientras que en el *carcinoma* de páncreas hay cifras altas o bajas, que dependen probablemente de los restos glandulares que perduran.

El Dr. Rodríguez Ollerós observa que el *choc histamínico peptónico o anafiláctico* determina *pancreatitis ligera*, que se revela por el *derrame de fermento a la sangre* (97).

En *diabetes* a veces se han observado cifras normales; otras, cifras altas o bajas de *amilasa* en sangre. Norby opina que en los casos de cifra baja de *amilasa* en diabetes se trata de atrofia de páncreas, causante de dicha diabetes.

En cuanto a la *amilasa* salivar, se ha observado que en las enfermedades del páncreas hay un aumento de la *ptialina* para compensar la falta de fermento pancreático.

En ayunas, la saliva normal acusa unas 1.600 U. W. (según Biedermann), que en los recién nacidos sólo viene a ser $\frac{1}{10}$ de ese valor.

La *actividad amilolítica de la saliva* se eleva después de tomar alimentos.

En la *subacidez gástrica* hay *disminución* de *amilasa salivar*, y paralelamente a la *hiperacidez* hay aumento de *amilasa* (Delhougne) (98).

En la *anacidez carcinomatosa* también se observa aumento de *ptialina*. Parece existe relación entre la secreción salivar y la secreción interna del páncreas, pues en la diabetes hay *disminución* de *ptialina*, y el tratamiento adecuado con *insulina* determina aumento de dicha *amilasa*. Si se extirpan las glándulas salivares, la diabetes por pancreotomía es más grave, y además la extirpación de las glándulas salivares determina aumento de los islotes de *Langerhans*.

La investigación de la *amilasa* en heces ofrece interés. La *amilasa* en el intestino es poco reabsorbida, y aparecería en su casi totalidad en las heces si no fuese destruida por la putrefacción albuminoidea. Su actividad puede ser suprimida en el intestino grueso por exceso de ácidos de fermentación o exceso de alcalinidad en la putrefacción.

Al investigar *amilasa* en heces debe ajustarse el pH a 6,4 (Goiffón-Tallarico).

Cuando las heces contienen alimentos no digeridos, cabe dos hipótesis: insuficiencia de fermentos o evacuación demasiado prematura. En el primer caso estará ausente la *amilasa*, y en el segundo será tanto más activa la *amilasa fecal* cuanto que la estancia del contenido intestinal ha sido menor en el intestino grueso. *La ausencia de amilasa nada significa si la digestión es buena, pero tiene valor si los feculentos no están digeridos. La abundancia de amilasa en heces*

permite afirmar que se trata de una evacuación prematura cuando las fibras musculares, las grasas y los feculentos aparecen en las heces en cantidad anormal.

Marchionini y Ottenstein han investigado la amilasa en el líquido céfalo-raquídeo, observando que disminuye, hasta su desaparición total, en las diferentes formas de lúes cerebral espinal, disminución que está en directa relación con el *Spirochoeta*, pues éste posee la propiedad de destruir *in vitro* a la amilasa normal del líquido céfalo-raquídeo (99).

En 1874, Kussmaul inyectó a diabéticos amilasa por vía endovenosa, apreciando disminución de la glucosuria. Rosenfeld y B. Ottenstein también utilizaron ese método. Rodríguez Ollerós ha estudiado en dos lotes de conejos la acción que sobre la glicemia y la amilasa de la sangre tiene, respectivamente, la inyección de amilasa e insulina, utilizando como amilasa saliva de boca sana y limpia filtrada en el vacío, y la inyecta intravenosamente, observando en la mayoría de los casos hiperglucemia.

En 1908, Wohlgenant observó que la ligadura del conducto total pancreático va seguida de efecto inmediato en la reabsorción de fermentos. También la ligadura del conducto de Stenon eleva el poder amilolítico de la sangre, y la acción favorable que se observa en el metabolismo de los hidratos de carbono es debida a la amilasa derramada, y por eso se ha propuesto sustituir esos peligrosos métodos quirúrgicos por administración parenteral de amilasas (100).

FERMENTOS PROTEOLITICOS

Pepsina.

La pepsina es el fermento proteolítico más importante de nuestro aparato digestivo; trabaja en medio ácido a un pH 1,6-1,8 y ha sido obtenido cristalizado por Northrop. Transforma los proteidos en peptonas, sin llegar nunca a la producción de amino-ácido y se prepara a partir de la mucosa estomacal del cerdo.

Cortesi, en su tesis doctoral, demuestra los defectos y desacuerdos de las principales farmacoformas en lo relativo a la titulación de la pepsina y propone un procedimiento sencillo y relativamente preciso para su titulación utilizando la edestina (globulina de las semillas del cáñamo), que puede servir de patrón para todas las farmacoformas (101).

En las células de la mucosa estomacal, la pepsina se halla al estado de pepsinógeno, siendo su activador el ácido clorhídrico, existiendo relación entre el contenido del jugo gástrico en ClH y su actividad péptica. La anacidéz con gran déficit de ClH se manifiesta también con déficit o ausencia de pepsina. En los valores de ClH bajos

la *curva de pepsina* es algo más elevada que la de CLH, pero para cifras de acidez normales o altas, ambas curvas son casi paralelas.

Según *Delhougne*, en el *cáncer de estómago* desciende la cifra de *pepsina*, descenso que es menos marcado en la *gastritis alcohólica* (102).

La inyección de *histamina* provoca *secreción de pepsina* siempre que no haya trastorno del parénquima glandular.

Rostock observa fuerte aumento de *pepsina* en la *úlcera péptica de yeyuno* y completa ausencia en el *carcinoma ventricular*, mientras que en la *aquilia refractaria* a la *histamina* todavía se acusa una ligera actividad (*Delhougne* y *Mullins*).

Pecenik ha estudiado la *uropepsina*, observando que durante la digestión aumenta la *pepsina urinaria*, para descender en la fase de interdigestión (103).

Tripsina

Kuhne, en 1867, señaló diferencias entre la digestión estomacal y la digestión intestinal y propuso el nombre de *tripsina* para el fermento del páncreas.

Kunitz y *Northrop* obtuvieron en 1932 la *tripsina cristalizada*.

La *tripsina* tiene, según *Waldschmidt-Leitz*, un pH óptimo entre 8,2 a 8,7.

La *tripsina* lleva la hidrólisis de las proteínas y peptonas hasta la producción de amino-ácidos.

Para investigar la *tripsina* en el *jugo duodenal* se sigue la técnica de *Gross-Fuld*. La investigación de este fermento en las heces no es tan corriente como la investigación de la *amilasa*.

Baumann (104) ha demostrado la existencia en la orina normal de una *tripsina* que a pH 8,5 desdobra a la caseína. Se observa aumento de actividad en la *tripsina urinaria* en las enfermedades en que participa el páncreas.

La acción proteolítica de la *tripsina* es utilizada en aplicaciones locales, pues su capacidad para digerir la proteína de tejidos muertos es extraordinaria. En las fábricas de *pancreatina* de la G. W. Carnrick Co. se ve a los obreros sangrar por los dedos, las palmas de las manos, narices, etc., y el examen de esos sitios revela que el polvo finísimo de *pancreatina*, asentándose en las superficies húmedas, digiere las capas muertas de la epidermis, dejando sólo la capa de epidermis viva.

Se usan los polvos de *enzima pancreático* y ungüentos preparados con los mismos para el tratamiento de *forúnculos*, *acné vulgar*, *eczema seborreico* y también para el tratamiento de *úlceras antiguas* y recientes, *heridas* que surgen por *cauterización* con *ácidos* e incluso *extensas quemaduras de segundo grado*.

La *tripsina* forma parte de diferentes preparados medicinales, *pan-*

creatinas, festal, etc., que se utilizan para *auxiliar la digestión en los trastornos funcionales del páncreas*.

Mocoroa, en su tesis (105), propugna el empleo de la *técnica de Willstätter* para valorar la *fuerza proteolítica* de los preparados comerciales que contienen *fermentos proteolíticos pancreáticos*.

En la industria de la curtición se emplean distintos preparados, *oropón, peroly, etc.*, que contienen *tripsina*, para la obtención de *cueiros finísimos*.

Peptidasas.

En el suero de sangre normal de diversas especies de animales existen *peptidasas* (*Grassmann-Heyde*) (106).

En el suero de personas sanas la *peptidasa* se presenta con gran constancia, experimentando variaciones en procesos patológicos. En enfermedades febriles (*angina, sepsis*) aumenta la *cifra de polipeptidasas*; por ejemplo, con respecto a *dl-leucil-glicil-glicina*.

Abderhalden y colaboradores han hallado en la orina de personas normales y enfermas *peptidasa*, que sólo rompe a *polipéptidos* grandes, y *dipeptidasa*, que actúa sobre *dipéptidos*. Algunas orinas sólo actúan sobre las peptonas.

Böhmig considera el aumento de esos fermentos como exponente de muerte celular, de destrucción del parénquima hepático, y *deduce la alta importancia que su determinación puede tener para el diagnóstico de las enfermedades del hígado*. En el comienzo de la *ictericia catarral* hay aumento en la *polipeptidasa sanguínea*, sin aumentar la de la orina, y cuando viene la curación se halla cifra alta de *polipeptidasa urinaria* y normal la de la sangre.

Cuajo animal.

La *presura* o cuajo es un fermento que existe en nuestro jugo gástrico y que se extrae industrialmente del *cuajar* de terneros en lactancia. Se utiliza para coagular la caseína, primera fase industrial de la fabricación de los quesos. La *presura*, por su ligera acción péptica, interviene (junto con otros enzimas de origen microbiano) en el proceso complejo de maduración de los quesos.

El óptimo de acción del *cuajo animal* es a 40° y es un fermento que necesita la presencia de iones de calcio para coagular a la caseína, pues la leche oxalata da no coagula por la acción de dicho fermento.

Se ha discutido si la *pepsina* y el *cuajo* eran un mismo fermento o se trataba de dos fermentos bien diferenciados. *Hammarsten* (que ha publicado numerosos trabajos sobre el cuajo) opina así: "La *pep-*

sina es el fermento proteolítico más fuerte del jugo gástrico, y la *quimosina* o cuajo actúa en condiciones bien determinadas en medios débilmente ácidos, en los que la *pepsina* no es eficaz, y por eso, gracias a la presencia simultánea de estos dos fermentos proteolíticos, próximos parientes, la digestión de la albúmina en el estómago está asegurada en todos los grados de acidez.

La coagulación de la leche por la presura no es más que una acción parcial de la quimosina.

Cuajo vegetal.

El *cuajo* procedente de la *higuera* es, sin duda, el fermento coagulante más conocido en la antigüedad, pues era utilizado ya en los tiempos de *Homero* para la *coagulación de la leche*. En Mallorca se cuaja la leche hirviéndola, y cuando está aún caliente remueven el líquido mediante ramas jóvenes de higuera hendidas en cruz.

Chodat y *Rouge* extrajeron la *sycquoimasa* de la *higuera* y comprobaron que trabaja a temperaturas altas, 75-80°, y que la leche oxalada (precipitación de los iones de calcio) coagula bien (*diferencias esenciales entre el cuajo vegetal y el animal*).

Existen muchas plantas que se utilizan para cuajar la leche; las *flores de alcachofa* se encierran en un saquito y se colocan en leche hervida; otros utilizan las *sumidades floridas* de diversas especies de *Galium* o las hojas de *Pinguicula vulgaris*, y en el Japón, las hojas de la *morera de papel*.

Proteasas vegetales.

Ya en 1850 se observó que la pulpa del fruto del papayero (*Carica papaya*) es capaz de digerir la carne. Los indios de América atieran la carne rodeándola durante una noche con hoja de papayero. La *mosca mediterránea*, cuando deposita sus huevos en los frutos del papayero, son digeridos por su *proteasa*, y por eso dicha planta no es afectada por ese díptero, que tantos estragos causa en otros frutales.

La *papaína* es el fermento proteolítico que se extrae del fruto del papayero. Los trabajos de *Willstätter*, *Grassmann* y *Ambros* han demostrado que el CNH ejerce *acción quinasa* para la *papaína*, cuyo dominio de especificidad aumentan.

La *papaína* es activada, además del CNH, por el SH₂ y por la cisteína.

La temperatura más favorable para su acción es la de 65-70°, y el pH óptimo varía con la naturaleza del substrato: 4,8 si se trata

de la gelatina, 5,1 para la peptona de la albúmina y 7,2 para la fibrina.

La *papaína* se utiliza como *fermento proteolítico* para combatir ciertos trastornos de la digestión por insuficiencia de fermentos proteolíticos, y además la *papaína* bruta saponifica las grasas con bastante energía.

Harris ha utilizado la *papaína* en *otitis media purulenta*, llenando el conducto auditivo con disolución reciente de extracto de *C. papaya*, deja actuar durante algunos segundos y seca después el conducto; bajo la acción del fermento se disuelven los tejidos necróticos y se limpia así la mucosa inflamada. También se ha utilizado en inyecciones en la trompa de Eustaquio, en el empiema de dicho conducto, con buenos resultados.

Disolviendo 5 cgs. en 1.000 c. c. de suero fisiológico *Hartmann* y depositando en el peritoneo, después de acabar una intervención quirúrgica, se evitan las adherencias en individuos propensos, por su escaso poder fibrinolítico, a grandes adherencias (108).

Gaston Ramon, Mlle. Germain Moureaux y Pechon han estudiado la preparación de medios de cultivo a base de digerido de carne de caballo con *papaína*, resultando así un medio de preparación fácil y a precio reducido y que puede reemplazar ventajosa y económicamente al medio *Martin* para la obtención de la toxina diftérica. También puede emplearse la *papaína* para la obtención de peptonas industriales baratas en diferentes grados de degradación (109).

Robbins y Lamson, en un trabajo sobre las *proteasas de la higuera* (110), han determinado que el fermento de naturaleza *tripsínica del jugo de la higuera* es capaz de digerir *Ascaris* vivos y que son muy activas seis especies de higueras sudamericanas. Es interesante destacar que mientras que los *Ascaris* están protegidos por sus *antifermentos* contra la digestión por la *pepsina* y la *tripsina* en el intestino, no son capaces de resistir a la *proteasa* de la higuera. Recordemos también que el jugo de los higos y el látex de la higuera se utilizan para quitar las verrugas.

Del fruto de la *Ananasa sativa* (piña americana) se extrae un fermento proteolítico, la *bromelina*, parecido a la *papaína* y susceptible también de activarse por el CNH y por el SH₂. Se ha estudiado *in vitro* la acción *antihelmíntica del zumo de la piña americana* sobre *Ascaris*; estos gusanos quedan muertos en tres ó cuatro horas, siendo atacados los gusanos vivos. El zumo conserva el efecto antihelmíntico hasta la dilución de $\frac{15}{100}$, se inactiva a partir de la temperatura de 65° y las conservas de piña resultan ineficaces por la inactivación del fermento por el calor (111).

En la secreción del tejido glandular de los tentáculos de dos especies de *Nepenthes* se ha demostrado la presencia de dos *proteínas*, correspondientes en cada caso, con arreglo a su reacción óptima, a

la *tripsina* y a la *catepsina*, pero careciendo de los correspondientes mecanismos de activación.

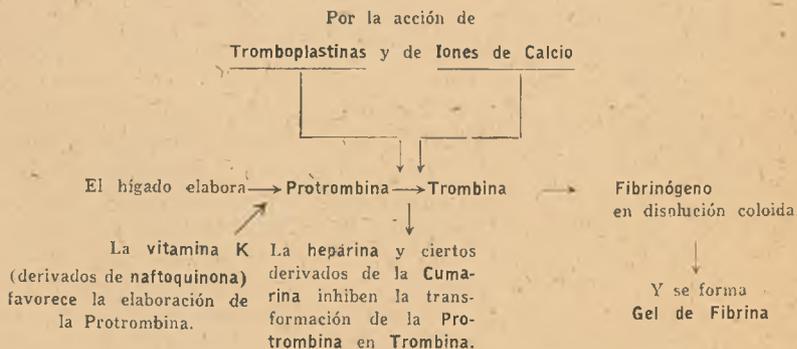
La secreción de *Drosera rotundifolia* contiene *proteínasa*, cuyas propiedades son intermedias entre la *pepsina* y *papaína*.

Fermento coagulante de la sangre.

La coagulación de la sangre es un proceso físicoquímico, en el cual la *trombina* transforma a la disolución coloidal de fibrinógeno en gel de fibrina.

El hígado elabora la *protrombina*, que por la acción de las *tromboplastinas* de las plaquetas, y de los tejidos, y de los iones de calcio se transforma en *trombina*.

En los *hemofílicos*, el defecto en la coagulación sanguínea radica en la *insuficiencia de tromboplastinas*.



La *vitamina K*, natural o sintética, y ciertos *derivados de la naftoquinona* estimulan al hígado en la elaboración de *protrombina*. La *hipoavitaminosis K* se refleja en la sangre por *hipotrombinemia con tiempo de coagulación y de protrombina aumentados*.

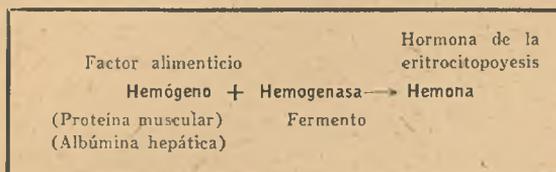
La *heparina* y ciertos *derivados de la cumarina* (activos éstos por vía oral) se oponen a la transformación de la *protrombina* en *trombina*, y por eso se emplean para prevenir embolias y trombosis y facilitar las operaciones en vasos, pues dificultan la coagulación de la sangre *in vivo*.

Según *Waldschmidt-Leitz*, la *trombina* es un *fermento proteolítico*. *Mellamby* afirma que la *trombina* es un *fermento proteolítico*, cuya acción consiste en desdoblarse al fibrinógeno en fibrina y suero globulina. *Fischer* ha purificado dicho fermento y afirma tratarse de un *lipoproteido* que contiene calcio (112).

LA HEMOGENASA Y LA ANEMIA PERNICIOSA

La *anemia de Biermer* se atribuye a la insuficiente entrada de un factor externo alimenticio o a la insuficiente o nula transformación de un factor externo de naturaleza vitamínica en el *principio anti-pernicioso* por la acción de un *fermento proteolítico*.

Lasch cree haber hallado un medio de diagnosticar la *anemia perniciosa*, basándose en que muchas veces ha confirmado que dicho *fermento proteolítico* existe en el *jugo gástrico* de las personas no afectadas por dicha enfermedad y en cambio está ausente del *jugo gástrico* de los que padecen dicha anemia.



Observa *Lasch* que en el *jugo gástrico* de personas sanas la sustancia *antiperniciosa* se origina de sustancias evidentemente albuminoideas, como es la carne. La investigación de la *hemogenasa* es delicada, pues es indispensable eliminar previamente la acción *péptica* y *tríptica* del *jugo gástrico* (113).

Fermentos proteolíticos y valor antigénico de los extractos de Polen

Los Dres. Arjona y Alés (en el Instituto de Investigaciones Médicas del profesor *Jiménez Díaz*) han estudiado la acción de los fermentos proteolíticos, *papaína* y *tripsina*, sobre el *valor antigénico* de ciertos *extractos de polen*.

Operan con extractos acuosos de polen de *Lolium perenne* filtrados por filtros *Seitz*. Han demostrado que la sustancia reaccionante del extracto de *Lolium perenne* no es probablemente de naturaleza proteica, pues esos extractos, tratados con *tripsina* y *papaína*, no tienen nitrógeno proteico.

Utilizando suero de enfermo sensible al *Lolium perenne* y rico en *reaginas* para ese antígeno, practican la *prueba de transmisión pasiva de Prausnitz-Küstner*, inyectando $\frac{1}{10}$ a $\frac{2}{10}$ c. c. de suero de ese enfermo a individuo sano, y en otro lugar de la piel inyectan igual cantidad de suero normal. A las veinticuatro horas, en la zona inyectada con el suero de enfermo comprueban que está la piel sensibilizada localmente a los extractos de polen de L. p., tratados como

hemos dicho, pero si las proteínas son responsables de la acción anti-génica la reacción no sería positiva, pues dichas proteínas han sido destruidas por la papaina y por la tripsina.

INVESTIGACION DE FERMENTOS EN EL JUGO DUODENAL

Es difícil diagnosticar las alteraciones de las glándulas digestivas abdominales. La determinación de fermentos en el jugo duodenal constituye elemento valioso para diagnosticar las enfermedades del páncreas, especialmente investigando por el llamado método de sonda duodenal fraccionado, ideado por Berger, Hartmann y Leubner (114), que consiste en introducir la sonda, extraer la secreción espontánea, y, aunque no siempre, en el 70 % de los casos hay una excitación producida por la sonda. Cada cinco minutos se van extrayendo porciones de jugo duodenal y se analizan: la *amilasa* expresando su actividad en *U. W.* a 37°,30' por c. c.; *tripsina*, en unidades *Gross-Fuld* 37°,30', y *bilirubina*, en mgs. %. A la hora de la primera extracción se introducen 20 c. c. de aceite de oliva a la temperatura del cuerpo (prueba de carga); el aceite ejerce acción excitante, que nos refleja la función, y nuevamente se va extrayendo jugo duodenal cada cinco minutos durante dos o tres horas más. Se analizan, también en estos jugos la *amilasa*, la *tripsina* y la *bilirubina*, y con todos los datos obtenidos se construyen las gráficas, que representan las variaciones de fermentos, de bilirubina y de la cantidad de jugo extraída en los tiempos sucesivos. Así han establecido, después de numerosas determinaciones, valores funcionales normales y valores de hiper e hipofunción.

Valores límites para *amilasa* y *tripsina* hallados por Berger, Hartmann y Leubner (115):

	Secrecn. espontánea		Efecto de excitación por la sonda		Acción del aceite	
	Amilasa	Tripsina	Amilasa	Tripsina	Amilasa	Tripsina
Valores de fermentos supernormales	1280	2048	10240	2048	5120	4096
Valores límite	960	1024	3840	1024-2048	3840	2048
Normal	320-640	256	1280	512	1280	1024
Valores límite	320	128	960	256	960	512
Valores de fermentos hiponormales	160	16-24	640	128	640	128

Según Baumann y colaboradores, la mayor significación diagnóstica corresponde a la oscilación de la *amilasa*, teniendo menor valor

diagnóstico la investigación de la *tripsina*. Han establecido curvas para diferentes enfermedades.

El método de diagnóstico de los fermentos del páncreas por sondeo fraccionado del jugo duodenal tiene, frente a los restantes métodos de determinación de fermentos en sangre y orina, la ventaja de ilustrarnos sobre la función propia del páncreas; claro que el procedimiento ofrece algunas dificultades para el investigador y es algo molesto para el enfermo, que ha de tener metida la sonda duodenal durante tres o cuatro horas.

EL DRAMA PANCREÁTICO Y LOS FERMENTOS

El término del *drama pancreático* fué empleado por Dieulafoy para designar la forma típica de la pancreatitis aguda (116). Se traduce inicialmente por necrosis más o menos extendida del tejido glandular y hemorragia, y a continuación la *lipasa* desdobla a las grasas y produce las manchas de *esteatonecrosis*.

Se interpreta como un proceso de *autodigestión* primitiva de la glándula, *siendo necesario y suficiente que se active la tripsina de la glándula*. No evoluciona como un proceso infeccioso, aunque ciertamente el foco de necrobiosis de la glándula puede infectarse secundariamente, pero primitivamente es *aséptico*.

De los tres *fermentos* del páncreas nos interesa aquí muy especialmente la *tripsina*, y en segundo lugar, la *lipasa* (que desdoblado las grasas forma jabones, de ahí las manchas de bujía de la *esteatonecrosis*), sin olvidarme de que en las *pancreatitis* hay derrame del fermento *amílolítico* a la sangre; de aquí el alto *índice diastásico* de la sangre y de la orina, dato que precisamente se utiliza para su diagnóstico.

Vamos a admitir que en condiciones normales la *tripsina* es inactiva en las células glandulares y en los canales que la llevan al intestino, y con respecto a la *lipasa*, es de presumir que en la glándula sea poco activa, pero sabemos que se activa enormemente al mezclarse con la bilis.

¿Cómo se activa *in situ* en la propia glándula la *tripsina* para desatar el cuadro del drama pancreático por autodigestión? La asociación de *enteroquinasa* y del juego pancreático es eminentemente peligrosa para las células pancreáticas. Binet y Brocq han logrado *pancreatitis típica* inyectando jugo intestinal en las vías pancreáticas. La *ligadura del duodeno* determina el reflujo en el canal pancreático de los jugos que se vierten en esa primera parte del intestino y es igualmente *causa de pancreatitis*.

In vitro son capaces de activar a la *tripsina* ciertas sustancias, *quinasas*, tales como *leucoquinasas* y *bacterioquinasas*, que nos ex-

plican la posibilidad de pancreatitis por infección ascendente o sanguínea. Las *citoquinas* procedentes de la desintegración de las propias células pancreáticas por traumatismo o por necrosis primitiva pueden actuar igualmente.

La *bilis* parece desempeñar papel importante en el desarrollo de las pancreatitis hemorrágicas. *Brocq* y *Morel* inyectan bilis en el canal de *Wirsung* de un perro en digestión; el animal muere a las veinticuatro a cuarenta y ocho horas, y la autopsia revela derrame de sangre en la cavidad abdominal, hematoma de páncreas y manchas de esteatonecrosis sobre el páncreas y epiplón. Según *Calzavara* y *Latfès*, la *tripsina* es activada por un foco de necrosis de la glándula, necrosis cuya causa es variable y en especial que puede ser motivada por la bilis.

Leriche y *Arnaud* reducen la patogenia de la *pancreatitis aguda* a la activación intraglandular del jugo pancreático por las *leucoquinas* a causa de aflujo leucocitario permanente o pasajero. Los factores que engendran este aflujo leucocitario son múltiples: traumatismos, ligadura de las venas pancreáticas, inyecciones experimentales, infecciones generales, infección en la proximidad del páncreas (úlceras angio-colecistítica).

En condiciones normales, el reflujo del líquido duodenal a los canales pancreáticos es imposible. El esfínter de *Oddi* protege al cólecodo contra la hipertensión del contenido duodenal.

El canal de *Santorini*, habitualmente accesorio en algún caso, es la vía de excreción principal, y este canal, anormalmente desarrollado, pero desprovisto de esfínter en su terminación, es quizá incapaz de impedir la regurgitación del líquido intestinal cuando la presión en el duodeno está aumentada por los vómitos o por oclusión alta con obstáculo subvateriano.

Hay observaciones de pancreatitis hemorrágicas provocadas por *lombricosis* del canal de *Wirsung* (117). Las *lombrices*, cargadas de *entropoquinasa intestinal*, activan directamente a la *tripsina* en las vías pancreáticas, o vehiculan gérmenes, o actúan como agente traumático.

De todo lo expuesto se puede inferir que existen pancreatitis agudas de origen diverso: origen biliar y origen intestinal, pero también las hay de origen vascular por tromboflebitis o por embolia, o de origen infeccioso, y en estos casos la *tripsina* se activa por la acción de *quinasas celulares* nacidas en el foco de necrosis o por las *quinasas* contenidas en los *microbios* o en los *leucocitos*.

HISTAMINASA

La teoría de que la *histamina* es un mediador importante en la anafilaxia ha sido probada experimentalmente, *Lewis* ha demostrado

que existe paralelismo estrecho entre las manifestaciones reactivas de las pieles alérgicas y las reacciones de la piel a soluciones de histamina (118).

En la histamina formada en el intestino por descarboxilación de la histidina se ha visto el veneno principal de los estados de autointoxicación intestinal.

Mc. Henry y *Best*, en 1930, hallaron en la mucosa intestinal, en el riñón y otros órganos un fermento, la *histaminasa*, capaz de destruir a la histamina, liberando amoníaco de su cadena lateral y rompiendo su anillo. La misión de este fermento será la de mantener el *nivel histaminémico*.

Marcou manifiesta que en el parto hay *histaminolisis* para evitar las terribles hemorragias postpartum y que la gran resistencia de las parturientas al choque operatorio y anafiláctico y el aumento de la coagulabilidad sanguínea en esos momentos estarán en relación probable con esa destrucción de histamina (119).

La casa *Bayer*, en Europa, y en América la *Wintrop Chemical Co.*, preparan un medicamento, el *Torantil*, que contiene *histaminasa*, obtenida a partir del intestino delgado de reses jóvenes sanas. La *unidad de histaminasa* es la cantidad de fermento que descompone 1 mg. de clorhidrato de histamina en veinticuatro horas a la temperatura de 37°.5.

El uso terapéutico del *torantil* se extiende a las enfermedades en que se supone hay producción excesiva de histamina en el organismo. Se han logrado buenos efectos en *colitis ulcerosa* y en algunos síndromes alérgicos, como la rinitis vasomotora y ciertas afecciones de la piel, mientras que su acción es dudosa en las gastritis y úlcera gástrica o duodenal, e improbable en el asma bronquial (120). Se han obtenido algunas mejoras en *casos graves de urticaria* y buenos éxitos en las *cirrosis hepáticas*.

Reitler recomienda en las enfermedades alérgicas utilizar la *histaminasa* por vía bucal, por cuanto por su carácter proteínico hay que esperar que puede a su vez transformarse en un alérgeno al ser aplicado por inyección (121).

ARGINASA

La *arginina* es un constituyente primordial de las proteínas y además se encuentra libre en el hígado.

La *arginasa*, actuando sobre la *arginina*, en presencia del agua le transforma en *urea* y *ornitina*. Este fermento abunda en el hígado de los mamíferos jóvenes, en particular en los machos, y existe también en las plantas. Su pH óptimo es a 9.5.

Los trabajos de *Krebs* y *Henseleit* (122) han demostrado que la *función uropoyética* en los mamíferos se logra a partir de la *argini-*

na, la cual por la *arginasa* engendra urea y ornitina; ésta, actuando como catalizador, fija una molécula de CO_2 y otra de NH_3 , y se convierte en *citrulina*, cuerpo que a su vez, fijando otra molécula de NH_3 , regenera a la arginina. El proceso puede continuar indefinidamente, pues no se produce déficit.

El hígado de los reptiles y aves no contiene *arginasa*.

El estudio de las diversas especies de animales confirma la relación entre presencia de *arginasa* y formación de urea; es lo que se llama la *ley de la arginasa de Clementi*.

Se ha investigado la *arginasa* en la sangre de portadores de tumores y en los tumores mismos.

Según Haddow (123), en los *tumores malignos* hay un aumento de *arginasa*.

Ottenstein (124), y más tarde Marchionini (125), han estudiado la *arginasa* en *dializados de piel* y han comprobado que ese fermento no existe en la piel de individuos adultos sanos, pero que aparece en ciertas enfermedades de la piel: *psoriasis* y *eczematoides*, así como en la piel de enfermos afectados de *cirrosis hepática*.

También existe influencia de las glándulas germinales sobre la *arginasa*, pues durante la menstruación existe *arginasa en la piel*, pero no antes y después de ese proceso.

LOS FERMENTOS EN LOS HONGOS

La mayor parte de los *Sacharomyces* contienen *zimasa*, pero ésta sólo disloca a algunos monosacáridos. Si se los alimenta con di o trisacáridos, la fermentación alcohólica no comienza sino cuando el *sacharomyces* dispone, además de *zimasa*, de un *fermento sacroclástico*. El *S. cerevisiae* contiene habitualmente *zimasa*, *invertasa* y *maltasa*, pero no *lactasa*, y por esto puede fermentar a la sacarosa y a la maltosa, pero no a la lactosa; en cambio, el *S. kefir* dispone de *zimasa*, *lactasa* e *invertasa*, pero no *maltasa*, y el *S. apiculatus* sólo contiene *zimasa* (126).

El *Mucor Rouxi* no contiene *invertasa*, y por eso no puede alimentarse de sacarosa; en cambio, el *M. Prainii* sí contiene dicho fermento.

En las levaduras, además de los fermentos que acabo de mencionar, existen: *proteasas*, *nucleasas*, *glicogenasa*, *amilasa*, *inulasa* (en *S. Pombe*), *fosfatasa*s, *lipasa* (en *S. Olei*), *carboxilasa*, *fermento amari-llero*, *fermento respiratorio*, *catalasa*, *redoxasos*, *carbolicasa*, etc.

Los *Aspergillus* contienen fermentos variados, y algunas especies se utilizan para su extracción industrial. Del *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. wentii* se extrae la *tanasa*; del *A. niger*, *A. Sydowi* y *A. tertius*, la *proteasa*; Takamine ha realizado interesantes trabajos sobre el *A. oryzae*, desde el punto de vista de su riqueza en fermentos, y

ha patentado la obtención, a partir de dicho hongo, de la *'takadiastasa*, que en realidad no sólo contiene *amilasa*, sino un *verdadero arsenal de fermentos* (127).

En 1899, Czapek descubrió en *Merulius lacrymans* el fermento que destruye a la *lignina*, y merced al cual dicho hongo causa tantos daños en las maderas de las casas.

Los *fermentos* son los arietes principales mediante los cuales los hongos invaden los tejidos vegetales y destruyen la madera, produciendo graves daños en los árboles.

El investigador de Calcuta S. R. Bose ha realizado estudios muy interesantes sobre los *fermentos de los hongos* (128). Divide a los hongos destructores de la madera en dos grupos: a), *destructores de lignina* y que producen anillo definido de oxidación (halo oscuro) cuando crece en agar al 2 % que contiene 0,2 % de tanino, y b), los *destructores de celulosa*, que no producen tal anillo cuando crecen en idéntico medio. El anillo es producido por la acción de las *oxidases* segregadas por las hifas. Bose ha obtenido dicho anillo de oxidación con cultivos de *Polystictus sanguineus*, *P. hirsutus*, *Daedalea flavida* y *Trametes cingulata*.

Lutz ha investigado (129) los *fermentos solubles* segregados por diversas especies de *himenomicetos* (*Corioclus versicolor*, *Stereum hirsutum*, *Polyporus pinicola*, etc.), y con ellos consiguió realizar la *descomposición enzimática de las hemicelulosas*, formadas por *arabanos*, *mananos* y *galactanos*, y que también son componentes integrantes de las gomas que existen en diferentes plantas, y por eso emitió la hipótesis de que *la formación de las gomas estaría ligada a la acción de los fermentos segregados por los hongos*.

El japonés Yamano ha estudiado los *fermentos* del *Fomes applanatus*, hallando *maltasa*, *invertasa*, *lactasa*, *amilasa*, *celulasa*, *hadromasa*, *pectinasa*, *emulsina*, *tanasa*, *ureasa*, *amidasa*, *aspariginasa*, *oxidasa*, *catalasa* y *zimasa*.

LAS BACTERIAS Y LOS FERMENTOS

Las bacterias para desarrollarse en los medios nutritivos en que se cultivan utilizan diversos *fermentos*, principalmente *carbohidrasas* y *proteasas*.

Los gérmenes que liquidan a la gelatina lo hacen mediante la *gelatinasa*; los que coagulan la leche mediante la *presura* (la coagulación de la leche por los ácidos se evita adicionando carbonato cálcico), algunas bacterias después de coagular la caseína la liquidan mediante *caseasas*.

La *fibrinolisisina* de los *streptococos* es una *proteasa* que transforma a la fibrina en peptonas y aminoácidos. Merced a este fermento los *streptococos* disponen de un arma capaz de romper las medidas de

bloqueo tomadas por el organismo, con lo que el absceso se transforma rápidamente en flemón. Dicho fermento ha sido obtenido de filtrados libres de células de *Strep. hemolítico*. Todas las razas de *St. hemolítico* aislados de personas enfermas actúan sobre el fibrinógeno humano (130).

Bessey y *King* han estudiado la actividad proteolítica de suspensiones lavadas y filtradas, por lo tanto, libres de células de *Cl. sporogenes* y del *Cl. histolyticum*, comprobando que ambos producen una exoenzima proteolítica, capaz de desmoronar a las proteínas en polipéptidos, resultando más activa la exoproteasa del *Cl. histolyticum*. Las células lavadas tienen desaminasas, más activas las del *Cl. sporogenes*, de marcada especificidad para la arginina y alanina, que son rápidamente atacadas, en tanto que la tirosina y cistina sólo lo son muy débilmente (131).

Burk, *Linewearer* y *Horner* han estudiado el sistema enzimático que cataliza la fijación del nitrógeno por el *Azotobacter* y llaman *Azotasa* al complejo enzimático total y *nitrogenasa* al enzima que se combina con el nitrógeno (132).

En un trabajo de *Wohlfeil* y *Wollenberg* sobre la importancia de la ureasa bacteriana para el diagnóstico diferencial y para la determinación de tipos en los gérmenes patógenos, dicen que "todas las *Bruceellas* dan ureasa positiva".

De preparados secos de *B. fluorescens liquefaciens*, extrayendo con agua en presencia de toluol, se ha obtenido un fermento, la aspartasa, de elevada especificidad, pues desanima únicamente al ácido aspártico transformándole en fumárico (133).

Green y *Stickland* han estudiado la hidrogenasa del *Bac. coli* y han demostrado que cataliza reversiblemente la reacción $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ y manifiestan dichos investigadores que es el sistema de oxidoreducción más negativo que ha sido observado en los seres vivos (134).

El *Bact. delbrücki* es un microbio productor de láctico, es anaerobio, no contiene catalasa y forma agua oxigenada aeróbicamente. *Bertho* y *Gluck* consideran este caso como el de una célula viva que simplifica la teoría de oxidación de *Wieland*, transportando directamente el hidrógeno sobre el oxígeno con formación de agua oxigenada. Este microbio no posee citocromo, pero sí fermento amarillo, y en cantidad no corriente (77 mgs. por kg. de peso seco) (135).

Sevag, en un estudio sobre la respiración de los neumococos, observó que el agua oxigenada que producen aeróbicamente y en medio azucarado reacciona con el ác. pirúvico formado, el cual, lo mismo que la adición de catalasa, protege a los gérmenes de la destrucción. Es decir, que la virulencia es destruída por el agua oxigenada y restablecida con la adición de catalasa o de ácido pirúvico (136).

Sobre catalasa bacteriana se han publicado multitud de trabajos. El grado de pureza bacteriana de la leche puede deducirse de su cifra de catalasa (137).

El agua oxigenada se emplea para esterilizar medios de cultivo; el exceso del peróxido que pueda quedar en el medio se destruye por adición de *catalasa*.

Sobre la *tirosinasa* en las bacterias véase el trabajo de Stapp (138).

Se ha discutido mucho la naturaleza exacta del *bacteriófago* de *Twort-d'Herelle*, tratándose para unos de un organismo filtrable ultramicroscópico, y para otros el *bacteriófago* es un enzima o sustancia parecida producida por las bacterias.

En el *bacilo de Koch* se han estudiado diversos fermentos: *lipasa*, *proteasas*, *reductasas*, *oxidasa*, *nucleasa*, *ureasa*, *fosfatasa*, pero a pesar de su elevada riqueza en grasas la *actividad lipolítica* de este bacilo no es superior a la que poseen otros gérmenes (139).

Arima y colaboradores preparan su vacuna A-O cultivando los bacilos en medios con *saponinas* y luego los tratan con *lipasas*, cuya procedencia no especifican, pero no sé cómo les privarán de las ceras, pues la *lipasa* no *saponifica a las ceras* (140).

LOS FERMENTOS Y LA ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LOS NEUMOCOCOS

Los trabajos de *Dubos* sobre el *análisis enzimático de la estructura antigénica de los neumococos* son tan interesantes, que pueden ser utilizados como método de estudio para la exploración citoquímica de las células bacterianas, y por eso los voy a detallar (141).

Sabido es que los *neumococos virulentos* se diferencian de las variantes avirulentas de su misma especie por la *presencia de cápsula* en aquellos. Basándose en la diferente constitución de los *polisacaridos capsulares* se pueden tipar los *neumas*.

Dubos y colaboradores han aislado del suelo bacilos capaces de descomponer en determinadas condiciones a los polisacaridos de los *neumos* de tipo III, II, V, VII y VIII. De dichos gérmenes se han extraído por autólisis *enzimas* capaces de hidrolizar a los correspondientes polisacáridos. El fermento que actúa sobre el polisacárido capsular del tipo III está adaptado específicamente a ese único polisacárido; de tal modo ha adaptado el germen su *sistema enzimático*, que es posible, con auxilio de estos *fermentos específicos*, establecer diferencias entre polisacáridos que dan reacciones cruzadas con específicos antisueros. Así, el *polisacárido* de la *goma de Acacia* que reacciona con el *antisuero* para el *neumococo tipo III*, no es afectado por el *fermento* que hidroliza al polisacárido del tipo III. Aún más notable es la diferencia entre las *enzimas* que atacan a los polisacáridos del tipo III y del tipo VIII de *neumos*. Ambas sustancias están compuestas de glucosa y de ácido glucorónico en diferentes proporciones, y por este parentesco químico exhiben cierta reacción cruzada con los antisueros; pero los fermentos bacterianos desarrollados para cada uno de esos dos

polisacáridos fallan en el ataque sobre el otro, es decir, que estos fermentos son aún más específicos que los propios anticuerpos obtenidos por inmunización experimental de animales.

¿Qué ocurre si se adiciona *polisacaridasa* tipo III al cultivo de neumos de tipo III? Pues se observa que no inhibe el crecimiento ni origina lisis en los neumos, pero éstos ya no son aglutinables (o lo son muy débilmente) con el antisuero respectivo; es más, la cápsula, tan fácil de detectar en el neumótipo III, ya no lo es después de ese tratamiento. *La acción del fermento se ha limitado a la cápsula y no ha afectado a la célula, pues esos neumos transferidos a medios desprovistos del fermento específico recobran su cápsula y su aglutinabilidad específica.*

¿El curso de una infección neumocócica podrá ser desviado en un animal susceptible por inyección de este agente hidrolítico? De hecho, afirma Dubos, se ha encontrado que el fermento tiene acción protectora sobre animales inyectados con neumos de tipo III, y su valor protector es destruido por calentamiento a 70° durante diez minutos. La acción protectora reside en la capacidad del *enzima* para descomponer a la sustancia capsular del agente infeccioso. Lo notable de *este fermento* es que ni es bacteriolítico ni bactericida; *destruye a la cápsula del neumótipo y éste queda así a merced de la acción de los fagocitos.*

Estos interesantes trabajos confirman que es el polisacárido el que determina la especificidad serológica del neumótipo y condiciona su virulencia.

Conocido es el hecho de que los neumos tratados por bilis o sales biliares se disuelven en pocos minutos (*), el antígeno capsular se inactiva al mismo tiempo, aunque el polisacárido capsular permanece inalterado. *La bilis actúa como activador del fermento autolítico y éste inactiva el antígeno capsular.*

La rapidez con que los neumos se lisan es una de sus más notables características, y ello se debe al *fermento bacteriolítico*, que experimentalmente puede ser utilizado para inactivar rápida y completamente el antígeno capsular de neumos virulentos.

La *lisis* se expresa por la pérdida de la Gram positividad, por desintegración del cuerpo celular y aclaración de la suspensión bacteriana. Si se someten neumos muertos por el calor o por el yodo a la acción de preparados activos del *fermento bacteriolítico*, pierden la propiedad antigénica de estimular en conejos la formación de anticuerpos precipitantes para el tipo específico de su polisacárido. De modo que el *sistema bacteriolítico* es capaz de inactivar el antígeno capsular de células muertas; pero para eso no es necesario la disolución total de las

(*) En los *hemocultivos*, una de las siembras se hace en bilis para que en este medio no se desarrollen los neumos y sí los gérmenes del grupo tífico-paratífico, aunque el profesor Rodríguez Illeras nos citó un caso de siembra de sangre en bilis (en un hemocultivo) y con gran sorpresa aisló de ese medio un neumococo que no se había lisado.

células; es suficiente hacerlas Gram negativas sin que pierdan su morfología, lo cual puede lograrse en determinadas condiciones de acción del *fermento bacteriolítico*.

Dubos ha estudiado también la acción de los *fermentos proteolíticos* sobre los antígenos capsulares y observado que las células muertas de neumos, son resistentes a la *pepsina*, pero muy sensibles a la *tripsina*; con ésta y *quimotripsina* se aclaró la suspensión y vió que el 75 % del peso celular se solubilizó y que el residuo no atacado por la *tripsina* sólo contenía el 8 % del N total. La observación microscópica de los neumos así tratados reveló que continuaban como cocos gram positivos, algo menores en tamaño que los de control, y que la suspensión de estas células digeridas, inyectada a conejos por vía intravenosa, provocaba la formación de anticuerpos, especialmente dirigidos a su tipo de polisacárido. Es decir, que la *digestión proteolítica* remueve de los neumos gran parte de las proteínas, pero deja una estructura residual que reacciona positivamente al Gram y se comporta aun como antígeno capsular.

También *Dubos* ha estudiado la acción de un *fermento procedente de leucocitos polimorfonucleares* sobre la antigenicidad de los neumos. Dicho *fermento* destruye el carácter basofílico de neumos muertos por el calor e inactiva su antígeno capsular. Ese *fermento* no es capaz de desintegrar las células bacterianas, ni descomponer al propio polisacárido capsular; parece ser que ataca a la ribonucleína existente en el neumo.

Como las bacterias por su tamaño no se prestan a ser estudiadas por los métodos clásicos, los *trabajos de Dubos demuestran la posibilidad de utilizar las enzimas como reactivos específicos para estudiar las células bacterianas*.

ANTIFERMENTOS

Aproximadamente unos dieciséis *antifermentos* han sido estudiados, y *Sumner* los clasifica así: *Grupo 1*, sustancias que existen normalmente en los animales: *anticatalasa*, *antiglicoxalasa* o la *antitripsina* de la clara de huevo (*). *Grupo 2*, sustancias protectoras halladas en los nemátodos (*Ascaris lumbricoides* u otros parásitos intestinales). *Grupo 3*, *anticuerpos* obtenidos por la inyección de un *fermento* en algunos animales.

La *ureasa* aislada cristalizada en 1926 por *Sumner* es especialmente apta para obtener su *antifermento* específico, pues es estable al pH de la sangre, no existe en la sangre de los mamíferos y puede ser estimada con facilidad y con exactitud.

(*) Quizá en este grupo encaje la *antitipasa* descubierta por *Braun* en la semilla de *Abrus precatorius* (O. Fernández: «Los antifermentos en terapéutica», 1917).

La naturaleza extremadamente tóxica de la *ureasa*, aunque nada tiene que ver con su antigenicidad, le hace fácil de investigar en experiencias de inmunización activa y pasiva.

Aunque diversos investigadores han realizado experiencias (142) que indican la probable producción de *antifermentos*, estimamos que los trabajos de *Sumner* (143) son los primeros que prueban, sin género alguno de duda, que un *antifermento* puede ser producido y lo que son las propiedades generales de un *antifermento*.

En contraste con la *ureasa cristalina*, la *pepsina cristalizada* es prácticamente inservible para la producción de un *antifermento* porque es inactiva al pH de la sangre y porque el compuesto *pepsina-antipepsina*, sin duda, sería descompuesto a la reacción ácida que es necesario para comprobar la *actividad péptica*.

Carnot, Gerard y Moissonnier demostraron que la *ureasa* de soja es muy tóxica para los perros.

Tauber y Kleiner inyectaron disolución de *ureasa* cristalina a conejos y ratas y obtuvieron resultados similares.

El envenenamiento por *ureasa* es rápido y el efecto directamente proporcional a la dosis; 0,15 mgs. de *ureasa* cristalizada es mortal inyectada a conejo de dos kgs., debido probablemente a los iones NH_4 más que a la alcalinidad, ya que la muerte ocurre cuando el amoníaco de la sangre alcanza 5 mgs. por 100 c. c., cifra baja para ocasionar cambios en el pH.

En 1930, *Sumner* y colaboradores inmunizaron por vía intraperitoneal a conejos para la *ureasa*; estos animales podían tolerar más de 1.000 dosis letales de *ureasa*, y de su sangre obtuvieron por técnica especial la *antiureasa*, y aunque no lograron su cristalización puede decirse que es *el anticuerpo más puro que se ha logrado obtener*.

La *tripsina* tiene escasa o nula acción a pH 7 y 37° sobre dicha *antiureasa*; en cambio, la *pepsina* a pH 4,3 la inactiva.

Se valora la *antiureasa* por su capacidad para precipitar a la *ureasa*, a la cual puede precipitar a grandes diluciones, dando un apreciable enturbiamiento, aun cuando la dilución final alcance una concentración de una parte de *ureasa* en 600.000, lo que le llevó a *Sumner* a afirmar: "*Judged on the basis of this reaction crystalline urease is one of the most antigenic substances known.*"

En el método de valoración de *Sumner* se adiciona una determinada cantidad de disolución de *ureasa* cristalizada a un determinado volumen de disolución de *antiureasa*, se incuba a 37° durante media hora, después se centrifuga; el precipitado es *ureasa-antiureasa*, y la *ureasa* que sobrenada (debe ponerse en exceso) se valora por la técnica corriente. En esta técnica la *antiureasa* se expresa en *unidades antiureasa precipitantes*.

La antiureasa protege a los animales contra la acción tóxica de la ureasa. En el ejemplo siguiente de *Sumner* se aprecia el efecto sobre el amoníaco sanguíneo cuando se inyectan a un conejo normal 90 uni-

dades de ureasa, e igual dosis a otro conejo al que previamente se le han inyectado por vía intraperitoneal 90 unidades antiureasa.

	NH ₃ en mgs. de N en 100 c. c. de sangre		
	alcanzó	a la hora	a las dos horas
Conejo núm. 1, normal	0,1	4,4	5,0
Conejo núm. 2, inmunizado pasivamente	0,1	0,1	0,1

El animal núm. 1 muere. y al núm. 2 no le pasa nada.

Kirk y Sumner han demostrado que la antiureasa obtenida utilizando como antígeno la ureasa de la *Cannavalia ensiformis* precipita e inactiva a la ureasa de soja y protege a los conejos contra la soja-ureasa, de modo que el fermento parece ser idéntico en ambas semillas.

Estos trabajos demuestran la posibilidad de identificar fermentos con los antisueros específicos.

FERMENTOS DE DEFENSA

La reacción de los fermentos de defensa de Abderhalden está fundada en un principio de biología general: la aparición de fermentos proteolíticos dotados de gran especificidad frente a las albúminas extrañas al organismo introducidas por vía parenteral (144).

Los fermentos de defensa surgen en el momento y lugar precisos para defenderse de las proteínas extrañas; así, durante el embarazo aparecen en la sangre fermentos proteolíticos dirigidos contra las albúminas placentarias, y durante el cáncer, fermentos específicos de las albúminas propias del tipo de cáncer de que se trate.

Estos fermentos de defensa trabajan a un pH óptimo de 7; la adición de suero activa su acción, así como el SH₂. El enfriamiento refrena su acción y a 56° se inactivan.

La técnica de la caracterización de estos fermentos de defensa se ha simplificado mucho con la utilización de la orina (por la que se excretan dichos fermentos) en lugar del suero.

La orina (neutralizada si es preciso) es adicionada de volumen igual de acetona, se centrifuga el precipitado y su suspensión en suero fisiológico al 0,9 % de ClNa, se emplea como portadora de fermento, que se hace actuar sobre las albúminas frente a las cuales se desea inves-

tigar la existencia de un *fermento específico*. Si se trata de investigar *embarazo, carcinoma y trastornos de los órganos hormonógenos*, entonces el precipitado obtenido al agregar acetona a la orina se pone directamente en contacto con el *sustrato proteínico*. La casa *Promonta* de Hamburgo, prepara los *organognost*, polvos proteínicos de órganos.

La existencia de los fermentos se descubre indirectamente por la investigación de los productos de desdoblamiento de las proteínas respectivas. En el *método de diálisis* (muy utilizado al principio) se emplean *sacos de colodión de Schleich-Schull* (que deben ser impermeables a las proteínas); en su interior se colocan: la proteína y el producto problema en el que se va a investigar el *fermento específico*. Como reactivo para explorar la desintegración proteínica se utiliza la *ninhidrina*. Este método, sencillo en apariencia, es de técnica delicada.

Hoy se utiliza de preferencia el *método interferométrico de Hirsch*:

Existen también otros métodos, tales como el *refractométrico de Pregl*, el *método microscópico* y el *método espectrofotométrico* (estos dos últimos, lo mismo que el de *diálisis*, son del *prof. Abderhalden*).

El *campo de aplicación de la investigación de los fermentos de defensa es grande*.

En la actualidad no existe procedimiento que pueda aproximarse a la finura y sensibilidad en la diferenciación de proteínas que se consigue con este método. Ello ha permitido resolver diversos problemas; así, se ha podido reconocer que las proteínas de los mismos órganos o tejidos pertenecientes a animales diferentes tienen constitución diferente; que hay diferencias según el sexo; que una semejanza en la globina es la base de los diversos grupos sanguíneos; que pueden distinguirse las proteínas sometidas a la irradiación ultravioleta de las no irradiadas, etc.

Esta alta especificidad se apaga cuando la cantidad de albúmina inyectada al animal de experimentación sobrepasa cierto límite. Las *proteinasas* obtenidas en ese caso son capaces de atacar a los albuminoides emparentados con la albúmina inyectada. Se ha sacado provecho de esta propiedad para descubrir el parentesco estructural de las diversas proteínas en los estudios de la herencia, y se ha podido determinar en los bastardos la preponderancia paterna o materna. Este método se ha aplicado también a estudios de herencia en las plantas y al estudio de las diferencias entre los albuminoides de variedades de plantas resistentes al frío y de las que no lo son (145).

La reacción ha dado excelentes resultados en la diferenciación de proteínas de especies de bacterias muy próximas permitiendo distinguir los tipos de bacilos tuberculosos, paratíficos, etc.

En los *enfermos de tuberculosis* se ha demostrado que su *suero* tiene *fermentos dirigidos contra las proteínas bacilares*, y con tanta mayor actividad cuanto que su estado general sea mejor.

Dicha reacción ha permitido también reconocer la importancia de la flora asociada en los tuberculosos.

En la *grippe* aparecen *proteinasas específicas* al B. de Pfeiffer, lo que demuestra su participación patógena.

La *reacción de Abderhalden* rinde servicios en el *diagnóstico del cáncer*; pero es preciso tener bien presente que no existe un solo tipo de albúmina cancerosa, sino que la albúmina de la célula cancerosa ofrece carácter específico según su procedencia, es decir, que el reactivo, la proteína que se ha de utilizar para investigar en la orina el *fermento específico* debe proceder del mismo órgano enfermo, con igual naturaleza histológica que el tumor que se sospecha. Así, un cáncer del estómago sólo será revelado por un reactivo preparado con un cáncer gástrico; un reactivo preparado con cáncer del intestino no daría ningún resultado. Igualmente un cáncer pavimentoso del cuello del útero no podrá ser puesto en evidencia con una proteína obtenida a partir de un cáncer cilíndrico del cuello uterino (146).

Parece que hay cierta relación de parentesco entre la albúmina del tumor primitivo y la de las metastasis.

Por lo tanto, cuando clínicamente se sospecha la existencia de un tumor pero sin que se pueda precisar el órgano afectado y si existe un tumor para averiguar la naturaleza histológica del mismo, se hace indispensable efectuar diversas pruebas con diversas proteínas en relación con las diferentes hipótesis clínicamente verosímiles. Es necesario la repetición de los exámenes para cada enfermo, pues la eliminación de los *fermentos es variable*.

La existencia de *fermentos de defensa comprobada en diferentes tumos* permite afirmar el diagnóstico del cáncer, en tanto que su ausencia es un argumento valioso contra dicho diagnóstico.

En las *afecciones endocrinas* la *reacción de Abderhalden* es de gran valor para establecer un diagnóstico precoz y exacto, así como para estudiar la eficacia del tratamiento. Pero, afirma *Abderhalden*, sólo se puede reconocer el disfuncionamiento glandular sin poder precisar si se trata de hipo o de hiperfunción.

Durupt opina que en la mayoría de los casos un *valor fermentativo* elevado para la proteína de una glándula considerada se puede interpretar como un estado de hipofunción glandular (147).

Este método de investigación puede también informarnos sobre los estados intersexuales poco acentuados, pues estos enfermos tienen la particularidad de poseer *fermentos* para la glándula del sexo opuesto al suyo, a veces en mayor cantidad que para la glándula de su propio sexo (147).

Las múltiples posibilidades del *método de Abderhalden* le elevan a un primer plano en las investigaciones clínicas y biológicas.

Para el estudio de las *proteinasas defensivas* en el cáncer se han realizado en la Sección de Química Biológica del Instituto "Ramón y Cajal" diferentes trabajos. Unos dirigidos a obtener los substratos específicos procedente de tejidos tumorales, y otros destinados a com-

probar en los enfermos portadores de cáncer la eliminación en su orina de las proteinasas defensivas.

En estos trabajos se han obtenido los resultados siguientes:

Eliminación en la orina de los enfermos portadores de cáncer de proteinasas defensivas específicas. Desaparición de las proteinasas defensivas cuando ha desaparecido la tumoración y persistencia de ellas cuando han quedado restos de tumoración o existen metástasis. Aparición de proteinasas anespecíficas por acción de los rayos X sobre la tumoración.

Se han obtenido 20 substratos y las determinaciones se han llevado a cabo en 52 enfermos.

De los resultados de estos trabajos de los doctores Lucas Gallego, Santos Ruiz y C. Gil, se deduce que la investigación de los fermentos tiene aplicaciones al diagnóstico y tratamiento de los tumores (147 bis).

* * *

En la *enzimoreacción de Sivori y Rabaudi* fundada en la reacción de Abderhalden, se ponen los sueros problema en contacto con polipéptidos procedentes de las proteínas para las cuales el organismo ha elaborado *fermentos específicos*.

Mario Raspi ha aplicado la *enzimoreacción de Sivori* al estudio de los trastornos digestivos y nutritivos de los lactantes. Ha utilizado antígenos procedentes de leche de mujer y de leche de vaca, es decir, proteínas de esas leches hidrolizadas hasta el grado de polipéptidos, y las ha ensayado frente a sueros problema, comprobando con la ninhidrina la formación de aminoácidos. Según dicho investigador, el suero de niños lactantes alimentados al pecho y bien nutridos contiene *fermentos* para la leche de mujer y también *fermentos* para la leche de vaca, aunque en menor proporción. El suero de niños alimentados exclusivamente con leche de vaca y bien nutridos contiene *fermentos* más o menos activos para esta leche, pero la reacción es negativa para las proteínas de la leche de mujer. De estos hechos concluye *Mario Raspi* que la presencia en la circulación de *fermentos digestivos* para la leche de vaca o para la leche de mujer está en relación con la ingestión repetida de una o de otra leche.

Explica el hecho paradójico de que los niños alimentados al pecho poseen *fermentos* para la leche de vaca, admitiendo que éstos le son suministrados por la madre que bebe leche de vaca y que le llegan por la vía placentaria durante la vida intrauterina, o quizá por la propia leche materna después del nacimiento.

Ha observado que en las gastroenteritis agudas y en la atrepsia la reacción disminuye más o menos y puede hacerse negativa, y cuando el niño mejora y se cura entonces vuelve a hacerse positiva. El organismo enfermo pierde el poder de desintegrar los productos nitrogenados normales que han penetrado en la circulación por la vía digestiva (148),

LOS FERMENTOS Y LA ESTABILIZACION DE DROGAS

En la preparación de la *insulina*, a partir de páncreas de buey o de cerdo adultos, es necesario proceder previamente a la paralización de los *fermentos proteolíticos* del páncreas, macerando dichos órganos en líquidos ácidos o alcohólicos (de elevada concentración), pues de no hacerlo así la *insulina* es *digerida por aquellos fermentos*.

La preparación de la *vitamina A* y de la *vitamina D* a partir de hígados de peces es muy delicada, y cuando no es posible someter dichos órganos inmediatamente de recogidos a las operaciones de extracción es necesario *sustraerlos* de la influencia del aire y de la acción de los *fermentos* contenidos en dicho órgano (*pepsina, tripsina, peptasas, arginasa, creatinasa, lipasa, fosfatasas, etc.*), que provocan la *autodigestión* de tal forma que si no la evitamos se alteran aquellas vitaminas. La *inhibición de los fermentos* puede lograrse por el enfriamiento o bien por el calor. En la patente inglesa 401.095 se someten previamente los hígados durante 45 minutos a la acción del vapor a 70°-80°, temperatura que inactiva a los fermentos del hígado y al mismo tiempo mata a las bacterias que pudieran contener.

Hay ciertos productos vegetales que por su contenido en grasa se alteran fácilmente, sobre todo si están reducidos a polvo. Las *lipasas* actuando sobre los glicéridos provocan su acidificación, que es un paso para el enranciamiento. En esos casos el *desengrasado* previo del material le *estabiliza*. Se desengrasa el *polen* para conservarlo y preparar cuando convenga los extractos utilizados para las pruebas de sensibilización.

El *cornezuelo de denteno* se estabiliza por desengrasado. He tenido oportunidad de efectuar en los *Laboratorios Zeltia de Porriño* algunos ensayos con el polvo de cornezuelo estabilizado y he observado que su *riqueza en catalasa es extraordinaria*; ello no me sorprendió, pues el cornezuelo es un material rico en grasas (22-27 %) (*), y me era bien conocido el hecho de que los órganos vegetales ricos en lípidos, semillas oleaginosas y tubérculos oleginosos (chufa) son también ricos en dicho fermento. Los ensayos previos que hice para investigar *lipasa* en el cornezuelo estabilizado no me dieron resultados muy concluyentes.

Durante la *deseccación* de muchas plantas medicinales, sus principios activos experimentan *cambios que pueden motivar la disminución o la pérdida de su actividad farmacológica*.

Las plantas recién recogidas y puestas a desecar continúan vieniendo durante algún tiempo, respiran y consumen reservas de azúcares, almidón y posiblemente la fracción azucarada de ciertos glu-

(*) Dato que amablemente me ha facilitado el Dr. F. Calvet, de los laboratorios Zeltia.

cósidos. Por la transpiración, y muy especialmente por la evaporación, dichas plantas pierden agua, lo cual determina la pérdida de la turgescencia celular, rompiéndose el equilibrio osmótico de las células, por lo que el contenido de unas y de otras puede ponerse en contacto, sobreviniendo reacciones entre los fermentos y determinados principios activos (que no tienen lugar en la planta fresca): hidrólisis, con desmoronamiento de determinados edificios moleculares; eliminación de moléculas de azúcar (este es el caso de los glucósidos digitálicos); pudiendo quedar en libertad las agliconas, algunas de las cuales están desprovistas casi de actividad farmacológica o con actividad farmacológica diferente de las sustancias primitivas. Las agliconas, si son de naturaleza fenólica, pueden oxidarse fácilmente con intervención de las fenoloxidasas y transformarse en cuerpos nuevos, adquiriendo coloraciones, entre éstas los llamados rojos flavofénicos.

Hay plantas que al desecarse se ennegrecen, ennegrecimiento que puede ser debido a la acción de la laccasa sobre el laccol, de la tirosinasa sobre la tirosina; en otros casos se trata de oxidaciones tánicas, en las que intervienen oxidasas (caso de los frutos del *Viburnum lantana*, estudiado por el profesor Chodat).

Bourquetot y Hérissey descubrieron (149) en la *Aucuba japonica* un glucósido, el aucobósido, que se desdobra por la emulsina, liberándose aucubigenina, que es la que se transforma en un pigmento negro, responsable del ennegrecimiento de dicha planta. Ese es también el caso de los *Plantago*, estudiado por Bourdier (150), aunque, según Allice Senglet (151), también interviene en el ennegrecimiento de los *Plantago* la tirosinasa. Mlle. Braecke ha estudiado el ennegrecimiento de los *Rhinanthus* y *Melampyrum* y ha demostrado interviene también la emulsina sobre el aucobósido, con posterior transformación de la aucubigenina formada (152).

En el caso del *Orobis niger* L. = *Lathyrus niger* Bernh, la melanogénesis es debida a la oxidación de la hidroquinona (*) liberada por la acción de la emulsina sobre el arbutósido. Brevière (153) localiza el arbutósido en las preparaciones del *Orobis niger*, utilizando como reactivo la emulsina y caracterizando después a la hidroquinona formada. También hace actuar la emulsina sobre polvo de aquel material, y luego, por microsublimación, obtiene sublimado de hidroquinona (**).

No siempre los fermentos son responsables del cambio de color de

(*) Bourquetot y A. Fichténholz han demostrado que el arbutósido interviene en la producción de los tintes otoñales que adquieren las hojas de los perales. Hay hidrólisis del arbutósido y oxidación de la hidroquinona formada.

(**) La caracterización en las hojas de gayuba de la arbutina puede realizarse fácilmente colocando su polvo en porta con pequeña cantidad de emulsina y agua, y al cabo de algunas horas se efectúa una microsublimación y en el sublimado se caracteriza la hidroquinona.

las drogas durante la desecación. En muchos casos se trata de sustancias preexistentes (*yuglón*, en las hojas de *nogal* y *nuedes*; *dioxi-fenilalanina*, en la *Vicia faba*) que se auto-oxidan por las variaciones del pH celular durante la desecación. Como la desecación lenta conduce a la necrobiosis que desplaza el pH hacia la alcalinidad, por eso la auto-oxidación es tanto más intensa cuanto más dura la desecación; de aquí la regla empírica de desecar rápidamente las plantas para obtener drogas de buen aspecto.

Hay plantas que al desecarse desprenden olor a *salicilato de metilo*. *Bourquelot*, en 1894, observó que al partir el tallo de *Monotropa Hypopitys* se percibe claramente olor a salicilato de metilo; es debido a que contiene un glucósido del éster metilsalicílico el *monotropitósido*, el cual, por la acción de un fermento, la *gualterasa*, se desdobla en *salicilato de metilo* y *primverosa* (disacárido formado por xilosa y glucosa). *Bridel* demostró (154) que la *emulsina* es también capaz de hidrolizar al *monotropitósido*. Hoy se conocen muchas plantas que al desecarse desprenden salicilato de metilo; ejemplo, *corteza de Betula lenta*, *semillas de Ramnus utilis*, *hojas de Gualtheria procumbens* y en diversas *Poligalas*, *Primulas* y *Spireas*.

Las raicillas del *Geum urbanum*, aplastadas y frotadas entre los dedos, desprenden olor a *eugenol*. *Bourquelot* y *Hérissey* (155) demostraron que el eugenol procedía del desdoblamiento del geósido (*geina*) por la acción de un fermento, la *geasa*, que le desdobla en *eugenol* y *glucosa + arabinosa*. La *emulsina* no ejerce acción sobre el geósido contenido en los líquidos extractivos de raíces de *G. urbanum*, pero sí actúa sobre las disoluciones del geósido cristalizado (*Hérissey et Cheymol*, 156).

En la desecación de diversos *Melilotus* y de la *Asperula odorata* se percibe el olor a *cumarina*. La circunstancia de ser necesaria la desecación o de aparecer con tratamientos que provocan la muerte plasmolítica de las células hizo pensar a *Bourquelot* y *Hérissey* (157) que estaría en dichos vegetales la *cumarina* al estado de glucósido, y durante la desecación por la acción de la *emulsina* se desdobla, liberándose el perfume: la lactona del ácido ortocinámico o *cumarina*. *Delaunay*, aplicando el método bioquímico de *Bourquelot* y *Bridel*, ha demostrado la presencia en *Orchis purpurea*, *O. militaris* y *O. simio* de glucósidos de la *cumarina*, y en diversas orquídeas ha determinado la presencia de glucósidos de *vainillina*, basándose en la transformación de ésta por oxidación mediante *jugo de Russula delica* en la *dehidrodivainillina* (158).

Las hojas del *laurel cerezo*, al desecarse, huelen a *aldehído benzoico* y desprenden también CNH, debido a ponerse en contacto la *emulsina* y la *prulaurasina*.

Estas transformaciones, motivadas por la intervención de enzimas, pueden ser reproducidas rápidamente con los materiales frescos, sometiénolos a la acción de los *anestésicos* (159) o a la acción de *bajas*

temperaturas (160), agentes con los que se consigue provocar la *plasmolisis celular*, determinando la salida de agua con glucósidos de ciertas células y de agua con *fermentos* de las células que los contienen, y al ponerse en contacto éstos con los glucósidos provocan su hidrólisis, desprendiéndose CNH y aldehído benzoico en el caso de *glucósidos cianogénéticos*, *entregreciéndose* en el caso de plantas con *aucubósido*, liberándose *cumarina* en el caso de plantas con *glucósidos de la cumarina*, desprendiéndose *salicilato de metilo* en las plantas con *monotropitósido*, etc.

Vemos, pues, que durante la desecación pueden ocurrir cambios en la composición química de ciertas drogas, que se traducen en cambios de coloración y liberación de productos aromáticos, alterándose en muchos casos alguno de sus componentes, hasta el extremo de perder su especial virtud medicinal. La *genciana* contiene un glucósido activo, la *genciopirina*, el cual durante la desecación se hidroliza y pierde su actividad. La *Valeriana* contiene *ésteres del borneol* (valerianato, acetato y formiato), a los que debe su *acción antiespasmódica*, pero durante la desecación se hidrolizan, formándose *borneol libre* menos activo que cuando está esterificado y ácidos orgánicos como el *valeriánico*, de olor desagradable y de ligera acción estimulante.

Bourquelot, en 1900, dió cuenta en un Congreso de Medicina de los trabajos que venía efectuando desde el año 1890 y con los cuales *demonstró la importancia que los fermentos oxidantes tenían en la alteración de las tinturas y de otros preparados farmacéuticos*, así como su intervención en las transformaciones químicas de las drogas durante la desecación. Fué también *Bourquelot* el primero en iniciar los estudios sobre las *kolas* y en demostrar que el color rojo que aparece en su desecación es obra de *oxidadas*.

Perrot y *Goris* prosiguieron los estudios sobre la composición química de las semillas frescas de kola y demostraron que en ellas la *cafeína* estaba asociada a la *kolatina* y a la *kolateína*, y que durante la desecación se separaba la cafeína de su unión con la kolatina y con la kolateína por la acción de *fermentos hidrolíticos* y formándose, por intervención de *oxidadas*, el *rojo de kola* (161).

Las alteraciones que experimentan las plantas durante la desecación por la intervención de *hidrolasas* y *oxidadas* condujo a *Bourquelot*, *Perrot* y *Goris* a *estabilizar a las drogas* (destruyendo los fermentos en ellas contenidos) y a preparar extractos preparados con *plantas estabilizadas (intractos)*, que en muchos casos revelan acción farmacológica idéntica a la que se logra con plantas frescas.

Los *procedimientos de estabilización* han sido ampliamente divulgados entre nosotros por los ilustres farmacéuticos *Dres. Más-Guindal* y *Panadero* (162), y entre nuestros farmacéuticos especializados en la estabilización destacan, por su laboriosidad y competencia en la materia, el *Dr. Aurelio Gamir Sanz*, que estabiliza principalmente

digital y *bardana*, y el Dr. Colomer Pujol, que ha estudiado la estabilización de la *valeriana*, *retama negra* y *tabaco*.

Bourquelot estabilizaba las drogas sumergiéndolas en pequeños trozos en alcohol hirviendo. *Perrot* y *Goris* inhiben a los fermentos sometiendo las partes vegetales a la acción del vapor de alcohol a 95° y a la presión de $\frac{1}{4}$ de atmósfera durante tres a cinco minutos. También emplean el vapor de acetona.

El Dr. Gamir sigue el siguiente procedimiento para estabilizar las hojas de *digital*: inmediatamente de recolectadas, selecciona cuidadosamente las hojas enteras, sin rasgaduras ni aplastamientos, y las somete a la acción de los vapores de pineno en su aparato de estabilización.

Los órganos tales como raíces, rizomas y semillas pueden estabilizarse con vapor acuoso a unos 107° a 108°. *Siegfried* somete a las plantas en cámaras cerradas a la acción de una corriente de aire a 60-80°, que no destruye a los fermentos, pero los inactiva por deshidratación de las células.

Zyma, de Nyon (Suiza), prepara, a partir de plantas frescas, sus llamados *dializados Golaz*, sin someterlas a tratamiento térmico, por un método especial, que consiste en someter las plantas reducidas a pulpa a la *dialisis* con alcohol de 90° (163). El profesor Dr. R. Chodat demostró la presencia de *peroxidases* en dichos dializados, por lo que puede servir su determinación para diferenciarlos de las tinturas preparadas a partir de drogas desecadas o estabilizadas (164).

Es importante al estabilizar tener en cuenta la naturaleza de las paredes celulares, espesamiento de la cutícula foliar, composición del jugo celular, riqueza en albúminas y mucílagos, densidad de estomas en la superficie foliar, etc., circunstancias que pueden determinar el que para una planta determinada no se consiga destruir sus fermentos sino alcanzando una temperatura superior a la que haría falta para lograr el mismo fin en otra especie próxima.

En los Laboratorios Zeltia, de Porriño, he realizado algunos ensayos con hojas de *Digitalis purpurea* recogidas en los alrededores de la fábrica y con hojas de *D. lanata* de sus plantaciones, y en ambas especies he comprobado la existencia de *oxidasa* y *peroxidasa*. Las he sometido inmediatamente de recolectadas al siguiente tratamiento: las introduje en una estufa anhidra eléctrica de laboratorio calentada a 100° y mantuve durante dos horas la temperatura entre 100° y 80°, y después de ese tiempo dejé bajar la temperatura hasta 37°, permaneciendo las hojas en la estufa a esta temperatura durante veinticuatro horas. Pude comprobar que las *oxidases* desaparecen más rápidamente que las *peroxidases* y que la *oxidasa* de la *purpúrea* se destruye con más facilidad que la de *lanata* (el tegumento es muy diferente en ambas), pero en ambas al final de este tratamiento aún podía poner en evidencia las reacciones de la *peroxidasa*.

Se ha discutido mucho acerca de si es conveniente o no la *estabilización* de todas las plantas medicinales.

El *profesor Chodat*, en un trabajo que publicó en 1919 (164), decía, con respecto a la *estabilización de la kola*, lo que sigue: "Pero es un error pensar que por este procedimiento se ha conservado en la nuez de kola las propiedades de la semilla fresca. Los negros del Africa ecuatorial rehusarían utilizar la nuez de kola así preparada, pues desean obtener durante la masticación otro efecto y utilizar por este procedimiento los *fermentos* que contiene la nuez de kola fresca y que actuando sobre los *tano-glucósidos* conducen a hidrólisis y oxidaciones que aseguran una acción fisiológica determinada".

Al preparar el *té negro* se realiza durante la desecación una *fermentación*, resultado de la cual se libera la *cafeína* de su combinación glucosídica y el té además *adquiere su aroma y el color negro*; de modo que si *estabilizamos las hojas del té por el calor obtendremos el té verde, pero nunca un té negro*. En cambio, el *mate* (que desempeña en Sudamérica el mismo papel que el té entre los europeos y asiáticos) se somete a un *tratamiento* especial por los *yerbateros*, al objeto de *inactivar a los fermentos hidrolíticos y oxidantes* que contienen sus hojas, y así se obtiene el *mate estabilizado*, que es el que se consume; de no hacerlo así, el *mate se ennegrecería* por la intervención de *peroxidasa y tirosinasa*, como lo ha demostrado A. Sengbet (165), resultando un producto sin interés comercial.

Estabilizando los frutos del vainillero no se desarrollaría la fermentación especial en virtud de la cual se produce su principio aromático, la *vainillina*. Sería absurdo estabilizar las *almendras amargas y el laurel cerezo*, pues entonces no se liberarían de sus glucósidos respectivos, *amigdalina y prulaurasina*, el *aldehído benzoico* y el *ácido cianhídrico*, que nos interesan en la *esencia de almendras amargas* y en el *agua destilada de laurel cerezo*.

También sería absurdo la *estabilización de la mostaza negra*, pues entonces la *sinigrina* no sería desdoblada por la *mirosinasa* (integrada por dos fermentos: la *mirosulfatasa* y la *tiosulfatasa*), y entonces no se formaría el *isosulfacianuro de alilo*, al cual se deben las propiedades medicinales de dicha crucífera.

En cambio, la *pérdida de morfina* experimentada por el *polvo de opio* durante su conservación se estima es debida a una *oxidasa (opio-sa)*, que se destruye por calentamiento a 98°, y por eso se prescribe que el polvo de opio destinado a fines farmacéuticos debe ser calentado durante dos horas a 98° y después ajustarlo a 10 % de morfina anhidra.

La existencia de *oxidadas en las gomas y gomo-resinas* es causa de que directamente los *polvos de dichos productos sean incompatibles con productos fenólicos*: fenol, cresol, naftol, anisol, eugenol, vainillina, morfina, aloína, colchicina, etc., pues se producen coloraciones

por oxidación de estos productos. *Las gomas se estabilizan calentándolas a 80°, temperatura a la que se destruyen sus oxidasas.*

Las *tortas de lino* en general contienen pequeña cantidad de *linamarina* (glucósido cianogenético), pero a veces en cantidad lo suficientemente elevada para producir intoxicaciones en el ganado, dando cuenta el *profesor Moussu de Alfor*, en 1927, de accidentes mortales en el ganado a consecuencia de la ingestión de tortas de lino, ricas en CNH (166). La *linamarina*, por la acción de la *linasa* contenida en la propia torta de lino, en presencia del agua se transforma en glucosa, acetona y ácido cianhídrico, que es el agente tóxico. Ahora bien, *a estas tortas tóxicas se les puede privar de su toxicidad destruyendo el fermento hidrolizante de la linamarina* por tratamiento a 100°, y entonces dejan de ser peligrosas, pues aunque sigan conteniendo *linamarina* ésta no es desdoblada por la *emulsina* de la mucosa intestinal (167).

Por los ejemplos citados se desprende que *en unos casos conviene estabilizar y en otros la estabilización sería un absurdo.* El *Dr. Gamir* escribe a este respecto lo que sigue: "Creo que deben estabilizarse siempre aquellas plantas cuyos principios activos son glucósidos que fácilmente pueden ser destruidos por hidrólisis y oxidaciones consecutivas (digital, bardana, genciana, convalaria, etc.), y considero, en cambio, que no es necesario la estabilización en las plantas cuyos principios activos son alcaloides que aparecen salificados por los ácidos del vegetal y, por consiguiente, no se descomponen por la acción de los *fermentos hidrolíticos*. Téngase presente, sin embargo, añade el ilustre farmacéutico, que esta distinción no puede hacerse de manera absoluta, y por esto insisto una vez más en la necesidad de estudiar cada planta como un caso especial, porque la naturaleza de sus componentes puede constituir motivo de excepción" (168).

LOS GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS Y LOS FERMENTOS

En estos últimos años, el interesante grupo de *glucósidos cardiotónicos* ha revelado parte de sus secretos a los investigadores.

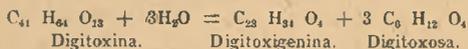
Se trata de hidroxil-lactonas de hidrocarburos esterínicos, en los que un grupo OH está conectado con una molécula de azúcar o con una cadena de varios azúcares.

En 1775 utilizó *William Withering* por primera vez la *digital*, y en 1785 publicó su interesante *Monografía* (169). Desde dicha fecha esta droga ha sido objeto de múltiples y cuidadosos estudios químicos y farmacológicos.

Antes de los notables trabajos del *profesor Stoll* se habían aislado de las hojas de *D. purpurea* tres glucósidos químicamente puros: la *digitoxina*, aislada en 1869, cristalizada por *Nativelle* (digitalina

cristalizada de *Nativelle*) y estudiada cuidadosamente desde el punto de vista químico y farmacológico por *Cloetta* (170); la *gioxina*, aislada pura por *Cloetta* y *Krafft* y estudiada por *Windaus*, y la *gitalina*, aislada también por *Cloetta* y estudiada por *Windaus*.

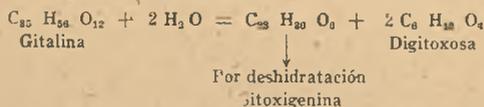
Por hidrólisis mediante los ácidos, la *digitoxina* da una molécula de *digitoxigenina* y tres moléculas de *digitoxosa* (desoxiazúcar responsable de la *reacción de Keller-Kiliani*):



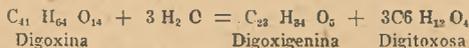
Por hidrólisis, la *gioxina* suministra *digitoxigenina* y tres moléculas de *digitoxosa*:



Por hidrólisis de la *gitalina* se obtienen dos moléculas de *digitoxosa* y una molécula de *hidrato de gioxigenina*, que por deshidratación pasa a *gioxigenina*:



En 1930, *Sidney Smith* aisló de las hojas de '*Digitalis lanata* no sólo la *gioxina*, sino un glucósido diferente de los hasta entonces conocidos, la *digoxina*, que por hidrólisis engendra tres moléculas de *digitoxosa* y una molécula de *digoxigenina* (isómero de la *gioxigenina*):



Jacobs descubrió que la *cimarina* es un constituyente esencial de la mezcla de glucósidos presentes en las semillas de *Strophantus Kombe*. La *cimarina* da por hidrólisis *estrofantidina* y *cimariosa* (metil-digitoxosa). (Véase esquema del *desdoblamiento enzimático del K-estrofantósido*.)

Jacobs y *Hoffmann* hallaron en las semillas de diversas especies de *Strophantus* un fermento, la *estrofantobiasa*, lieenzima que puede extraerse por el agua y que se caracteriza por su habilidad para remover todas las moléculas de glucosa de la *K-estrofantina-β* y de las *estrofantinas amorfas* más ricas aun en glucosa que aquélla (171). Fué el estudio de este *desdoblamiento hidrolítico enzimático* el que condujo a *Jacobs* a la conclusión de que los glucósidos más complejos

difieren de la *K-estrofantina-β* sólo por su mayor contenido en glucosa.

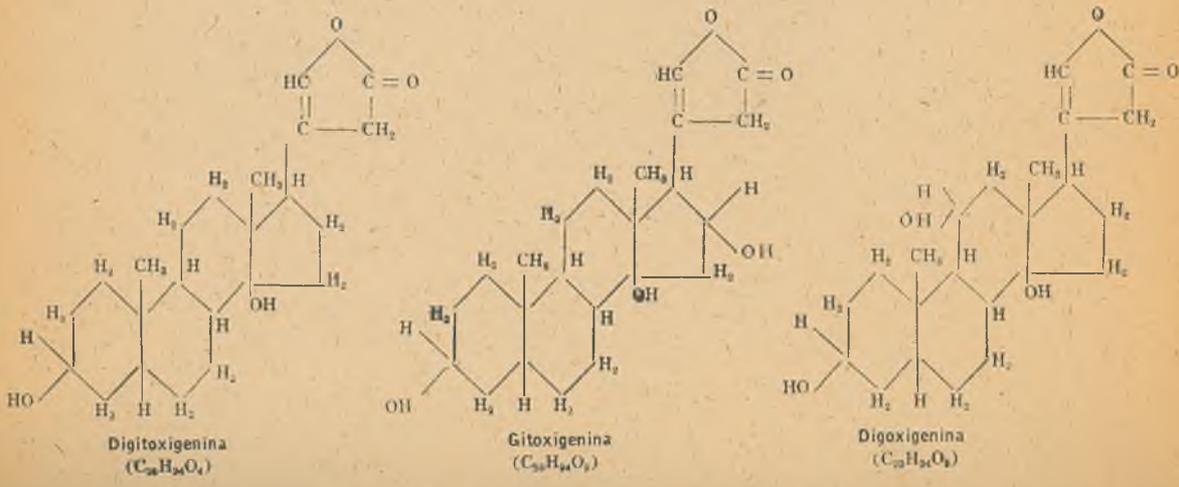
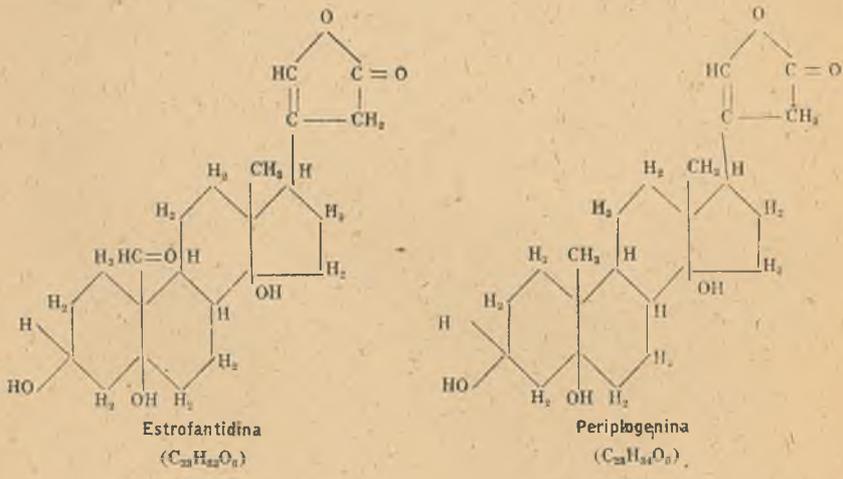
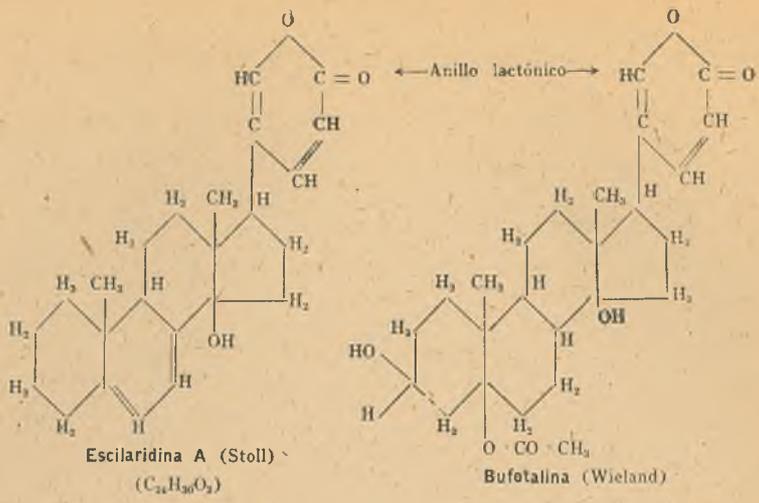
En las semillas del *St. Kombé* halló también *Jacobs* otra enzima que transforma a la *cimarina* en un isómero, la *alocimarina* (que ya no tiene acción cardio-activa apreciable). Dicha transformación afecta a la *estrofantidina*, pues la hidrólisis de la *alo-cimarina* suministra *cimarosa* inalterada, y como aglucona, la *alo-estrofantidina*.

El profesor *Stoll* ha podido aislar (en los Laboratorios Sandoz) el *K-estrofantósido puro* del *Strophantus Kombé*, que constituye el glucósido inicial, la sustancia madre de todos los glucósidos del *St. Kombé*. Dicho *K-estrofantósido* contiene una molécula de glucosa más que la *K-estrofantina* y su preparación fué lograda impidiendo la hidrólisis enzimática. Haciendo actuar sobre el *K-estrofantósido* el fermento extraído de las semillas de *Strophantus* (para el cual el profesor *Stoll* propone el nombre de *Strofantosidasa*) se separan dos moléculas de glucosa y se obtiene la *cimarina*, la cual por hidrólisis ácida se descompone en *estrofantidina* y *cimarosa*.

Si se hace actuar sobre el *K-estrofantósido*, la α -glucosidasa de la *levadura*, únicamente se separa la molécula de glucosa del final de la cadena y resulta la *K-estrofantina-β* (véase esquema). Esta separación de una molécula de glucosa por la acción de la α -glucosidasa prueba que esa molécula engarzada al final de la cadena de azúcares está unida bajo forma de α -glucosa (172).

Esta serie sucesiva de degradaciones nos revela de manera evidente los numerosos riesgos de degradación hidrolítica a que un glucósido cardio-activo inicial está expuesto cuando no se adoptan las precauciones especiales para la conservación y para el tratamiento de la droga.

En 1897, *Lehmann* aisló de la corteza de la *Periploca graeca* (Asclepediácea) un glucósido: la *periplocina*. *Jacobs* y *Hoffmann* trataron dicho glucósido con la *estrofantobiasa* y obtuvieron glucosa y *periplocimarina*, que por desdoblamiento ácido da *cimarosa* y la correspondiente genina, la *periplogenina* $C_{23}H_{34}O_5$, isómero de la *gitorigenina* y de la *digoxigenina*. Se diferencia la *periplogenina* de la *estrofantidina* ($C_{23}H_{32}O_6$) en que el grupo COH de la *estrofantidina* (véase el cuadro de fórmulas) está sustituido por un CH_3 (173):



El punto de partida de los trabajos de *Stoll* sobre los glucósidos digitálicos fué su estudio sobre los *glucósidos de la escila*, en el que utilizó métodos de investigación similares a los que habían seguido el *profesor Willstätter* y él en el estudio de la *clorofila* y de la *clorofilasa* (174).

El método que se sigue en los Laboratorios Sandoz, de los cuales es director técnico el profesor *Stoll*, para aislar los principios activos de la *escila* consiste en utilizar los bulbos lo más frescos posible, recientemente extraídos y los someten a un tratamiento suave de extracción y purificación, en el que procuran *evitar las acciones enzimáticas*, así como la degradación por agentes químicos (ácidos y bases); operan además a baja temperatura y a ser posible en el vacío. Así obtuvo el *profesor Stoll* el *escilareno A cristalizado* y el *escilareno B amorfo* (formado al menos por dos glucósidos).

Dejando varios días un triturado de bulbo cubierto con acetato de etilo obtuvo casualmente unos cristales algo diferentes del *escilareno A* en la forma cristalina y que eran menos solubles en agua, y que estudiados químicamente revelaron ser de una sustancia que contenía más glucosa y menos azúcar que el *escilareno A*. Se trataba de un producto nuevo, la *proescilaridina A*, formada por la acción de un fermento, la *escilarenasa* (contenido en el bulbo de *escila*), sobre el *escilareno A*. Había, pues, que *evitar esta acción enzimática* si se deseaba obtener un elevado rendimiento en *escilareno A*, que es el glucósido genuino. Se evita la acción de la *escilarenasa* agregando al triturado de los bulbos sulfato amónico, que *paraliza el fermento* (por precipitación de albúminas) y *al mismo tiempo coagula a las sustancias mucilaginosas*, con lo que se facilita la extracción por el acetato de etilo de los *glucósidos-tanoides*; luego separa *Stoll* los glucósidos de los tanoides por un tratamiento adecuado por sales de plomo, y, finalmente, obtiene cristalizado el glucósido puro, el *escilareno A*.

El *escilareno A* proporciona por hidrólisis ácida *escilaridina A*, menos activa y menos soluble que el *escilareno A*, y un disacárido, la *escilabiosa*, que por hidrólisis mayor da ramnosa y glucosa.

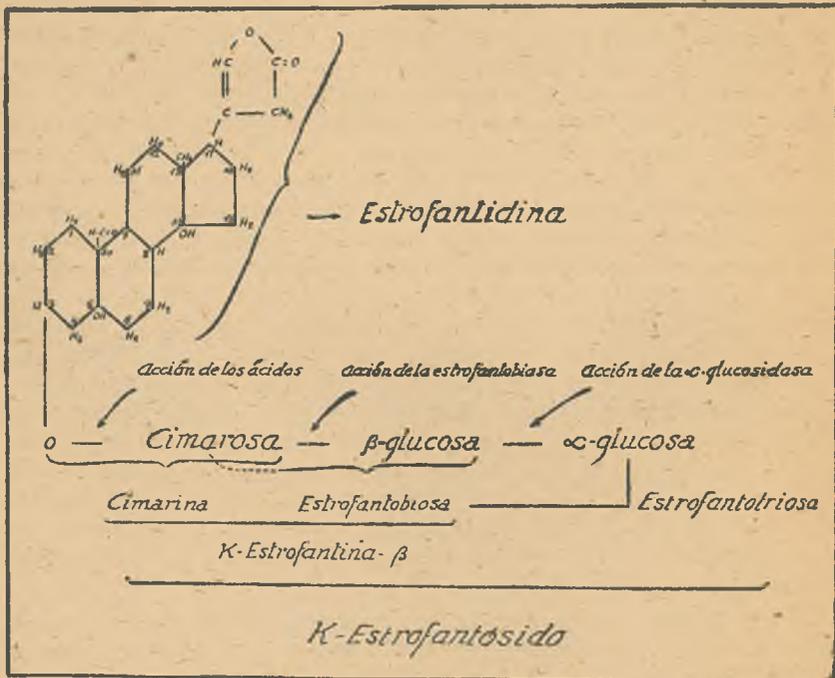
La acción de la *escilarenasa* se reduce a separar una molécula de glucosa engendrando *proescilaridina A* sin atacar a la ligadura de la *aglicona* con el disacárido (174).

La *escilarenasa* ha sido investigada por *Stoll*, *Kreis* y *Hoffmann*, y no ha sido posible obtenerla libre de células; se trata, pues, de una *desmoenzima* y es *específica para el escilareno A*, no atacando ni tan siquiera a la *escilabiosa* libre, siendo también inactiva frente a los glucósidos digitálicos, que también contienen, como el *escilareno A*, una molécula terminal de glucosa (175).

La experiencia lograda con el estudio de esta acción enzimática le sirvió al profesor *Stoll* de base para el aislamiento de los genuinos glucósidos digitálicos y para seguir su parcial desintegración.

El profesor Stoll ha demostrado que la parcial o total eliminación de azúcar de los glucósidos originarios engendra productos de menor actividad, observando en los glucósidos de la escila y de la digital que un menor contenido de azúcar implica disminución de la solubilidad en el agua y con ello disminución de la reabsorción intestinal, por lo que se comprende que la actividad de un extracto decrece con la disminución del contenido en azúcar de los glucósidos.

Los extractos crudos pierden fácilmente su actividad debido a fermentos que remueven moléculas de azúcar o provocan isomeriza-

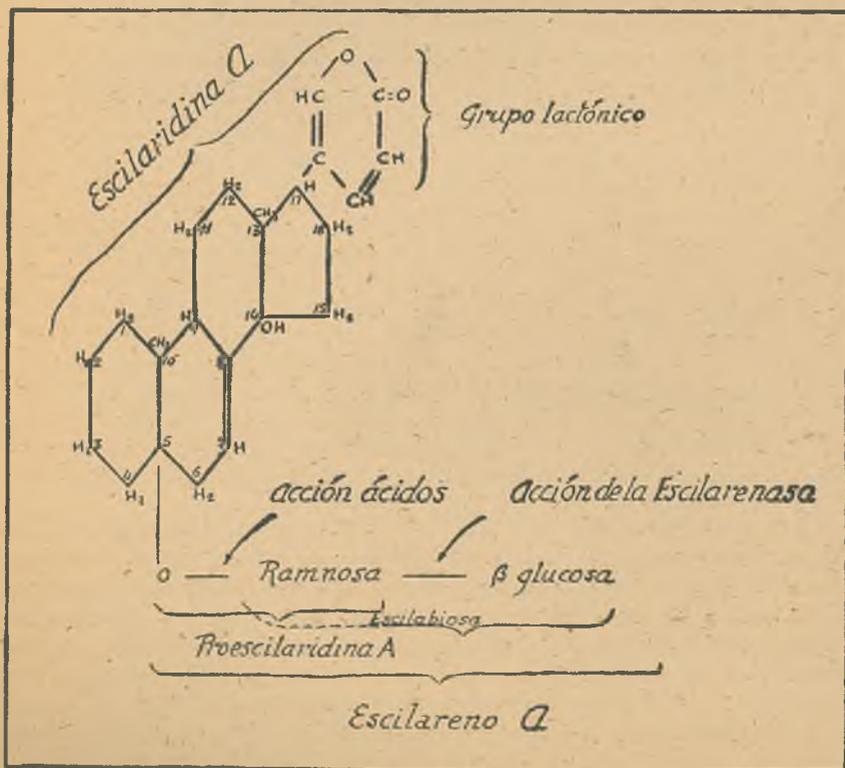


ción, como en el caso estudiado por Jacobs de la transformación de la cimarina en la totalmente inactiva alo-cimarina.

La desecación o almacenamiento de las hojas de digital sin las debidas precauciones o por tratamientos de extracción poco apropiados se traducen en la pérdida de parte de los azúcares constituyentes de los genuinos glucósidos, y ello con tal rapidez, que no se supo hasta hace poco que los tan conocidos glucósidos la digitoxina y la gitoxina de la *D. purpurea*, así como la digoxina, aislada en 1930 por Smith de la *D. lanata*, son en realidad productos derivados de los glucósidos originariamente presentes, los cuales contenían mayor cantidad de azúcar.

La experiencia lograda en el aislamiento del escilareno A fué la que le permitió al profesor Stoll aislar los glucósidos genuinos, preservándolos del desdoblamiento enzimático. La *Digitalis lanata* (originaria de los Balcanes) fué sometida a delicadas investigaciones por Stoll y colaboradores, los cuales trituran las hojas de *D. lanata* a baja temperatura con sales neutras, que precipitan a los glucósidos y al mismo tiempo inactivan a los fermentos; sigue luego un tratamiento con acetato de etilo, parecido al utilizado en la preparación del escilareno, y por fin aislan la mitad del contenido total de los glucósidos de la *D. lanata* al estado cristalino, formando el complejo digilánido, del que, gracias a la destreza y constancia del colaborador de Stoll, Walter Kreis, se consiguió separar sus tres componentes: el digilánido A, digilánico B y el C, los tres cristalizados.

Por hidrólisis ácida de estos digilánidos, conducida con cuidado para prevenir descomposición de la digitoxosa, se pudo comprobar la presencia de dos moléculas de digitoxosa y además se pudo aislar un nuevo disacárido, la digilánidobiosa (formada por una molécula de digitoxosa y una de glucosa). Además de los productos usuales

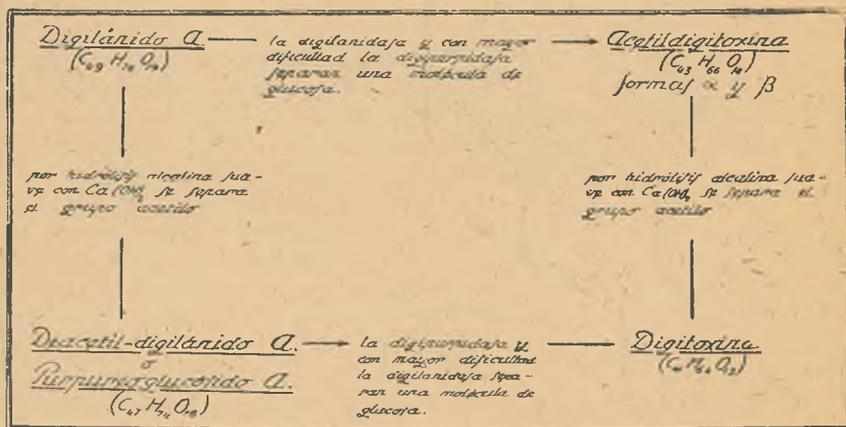


en la hidrólisis de los glucósidos (aglicona y azúcares), los *digilánidos* dan una molécula de acético, lo cual no se había observado en los glucósidos de la *D. purpurea*.

La hidrólisis del *digilánido A* da como aglucona la *digitoxigenina*; del *digilánido B* se obtiene la *gitoxigenina*, y del *C*, la *digoxigenina*, desconocido en el grupo de los glucósidos de la *purpurea*.

Es muy interesante el que por hidrólisis parcial de los *digilánidos A* y *B* se hayan logrado los *purpúreo-glucósidos A* y *B* de la *D. purpurea*. El grupo acetilo se separa de los tres *digilánidos* mediante hidróxido cálcico, con formación de los *deacetildigilánidos A*, *B* y *C*, en los que el anillo lactónico está aún intacto.

La separación selectiva de la molécula de glucosa terminal (véase esquema) se verifica por la acción de la *digilánidasa* contenida en la *D. purpurea*. La *digilánidasa*, y con menos intensidad la *digipurpidasa*, separan una molécula de glucosa de los respectivos *digilánidos*; al *digilánido A* le convierten en *acetildigitoxina*, que por eliminación del grupo acetilo (por hidrólisis alcalina suave) se convierte en *digitoxina*. La *digipurpidasa*, y con menos intensidad la *digilánidasa*, separan una molécula de glucosa del *deacetildigilánido A*, o *purpúreo-glucósido A*, y le convierten en *digitoxina* (véanse esquemas).

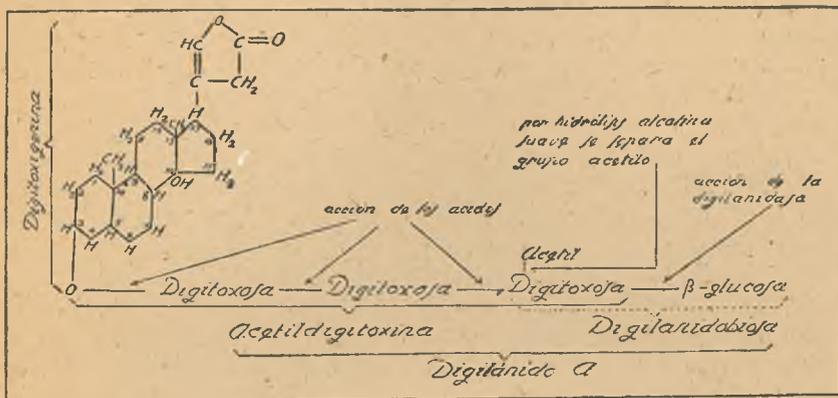


Los precursores de los dos más importantes glucósidos de la *D. purpurea*, la *digitoxina* y la *gitoxina*, se llaman *purpúreo-glucósidos A* y *B* y han sido aislados de las hojas de *D. purpurea*, pero no cristalizados, resultando el *purpúreo-glucósido A* idéntico al *deacetildigilánido A*, obtenido por eliminación del grupo acetilo del *digilánido A* y el *purpúreo-glucósido B*, idéntico al *deacetildigilánido B*, obtenido por eliminación del grupo acetilo del *digilánido B*.

La identidad de los *purpúreo-glucósidos A* y *B* con los *deacetildigilánidos A* y *B* se sostiene, obteniéndose de ellos por hidrólisis enzi-

mática con polvo de hojas de *D. purpurea*, digitoxina y gitoxina, respectivamente.

Los glucósidos genuinos digitálicos, lo mismo que el escilareno A y la K-estrofantina-β, reaccionan con los enzimas apropiados en tal forma que la molécula terminal de glucosa es separada en el caso del escilareno A, de la rammosa, en la K-estrofantina-β de la cimarosa y en los glucósidos digitálicos de la digitoxosa.



Tanto la digitalanidasa como la digipurpidaasa son desmoenzimas. Cuantitativamente muestran cierta especificidad para el sustrato propio de la planta en que se encuentran; así, la digitalanidasa separa una molécula de glucosa más fácilmente de los digitánidos que de los glucósidos deacetilados, o sea de los purpúreoglucósidos, en tanto que la digipurpidaasa hidroliza más fácilmente a estos últimos que a los digitánidos. Cualitativamente las enzimas y los substratos son mutuamente intercambiables. Ambas enzimas digitalanidasa y digipurpidaasa hidrolizan al escilareno A, pero en cambio la escilarenasa no ataca a los genuinos glucósidos digitálicos.

Ni la escilarenasa, digitalanidasa, ni la digipurpidaasa tienen acción sobre los disacáridos puros escilabiosa y digitalanidobiosa.

El profesor Stöll, en un reciente trabajo (176), da detalles técnicos para la preparación de la escilarenasa, digitalanidasa, digipurpidaasa y estrofantobiasa, así como también indica la forma de conducir los desdoblamientos hidrolíticos catalizados por dichos fermentos.

Vemos, pues, que en el caso de los glucósidos cardiotónicos los fermentos son los responsables de la disminución de su actividad, por separación de moléculas de glucosa, que determina una disminución de su solubilidad, y por eso si queremos obtener los genuinos glucósidos originarios es necesario operar en condiciones en que se eviten esas acciones enzimáticas; en cambio, si tratamos de obtener digitoxina es evidente que no lo lograremos a partir de hojas estabilizadas de *D. pur-*

purea, pues destruidos los fermentos específicos la molécula terminal de glucosa no se puede separar del purpúreoglucósido A sin que alteremos al mismo tiempo la estructura de la digitoxina.

Hemos visto también que el estudio de las acciones enzimáticas ha contribuido a dilucidar la constitución del escilareno A, del K-estrofanósido, de los purpúreoglucósidos y de los digilánidos, sustancias que la Providencia ha acumulado con tanto acierto en determinadas plantas, y de las cuales el farmacéutico las extrae para preparar medicamentos cardiotónicos, contribuyendo así a aliviar en sus dolencias a la Humanidad.

Lo expuesto nos permite destacar la extraordinaria importancia de la Enzimología por su vastísimo campo de aplicación, pero además nuestra propia vida está íntimamente ligada al buen funcionamiento del variadísimo arsenal de fermentos de que disponen nuestras células.

Los procesos vitales están, en efecto, supeditados al encadenamiento perfecto en el trabajo físico-químico o químico de los distintos biocatalizadores (fermentos, vitaminas y hormonas), y de tal forma que la ruptura de esa cadena por inhibición parcial o total, momentánea o definitiva de alguno de esos eslabones, pone en grave aprieto la vida, y por eso el derrumbamiento de un sistema fermentativo fatalmente conduce a la paralización de los procesos vitales, o sea a la muerte.

Hago votos para que nuestros investigadores participen activamente en la labor pura y desinteresada de escudriñar los secretos de la naturaleza, en este tema tan interesante como complejo y amplio de la Enzimología y sus aplicaciones, para bien de la Humanidad y gloria de nuestra Ciencia y en cumplimiento de aquella máxima hermosa del insigne Pasteur que merece ser esculpida en letras de oro en todos nuestros centros de enseñanza:

“LA VIDA NO VALE LA PENA DE SER VIVIDA SIÑO POR EL BIEN QUE PODAMOS HACER A NUESTROS SEMEJANTES”



BIBLIOGRAFIA

(1) De la edición «Les auteurs grecs expliqués d'après une méthode nouvelle... par une Société de Professeurs» (tomo correspondiente a los cantos 5 a 8), págs. 112 y 113, por el Prof. M. C. Leprévost. París, 1843.

(2) «Nouvelles observations sur l'eau oxygénée». *Ann. de Chimie et de Physique*. T. XI (1819).

(3) *Ann. de Chimie*. T. LIII, 73. T. LVI, 337 (1833).

(4) Bernard: «Influence de quelques cations sur l'activité amylolytique de la pancreatine», 1936. Univ. Toulouse.

(5) F. Mocproa: «Fermentos proteolíticos de los jugos gástrico e intestinal y de las glándulas que los segregan». 1934. Tesis, Dr. en Farmacia.

(6) «Ueber die Katalytische Wirksamkeit organischer materien und deren verbreitung in der pfl. u. Thierwelt.» *Zeitschr. f. prak. Chem.*, 89, 328 (1863).

(7) Green: «On the germination of the seed of Castor oil plant». *Proc. Roy. Soc. Vol. 48*, p. 370 (1889).

(8) Bertrand: «Recherches sur la laccase, nouveau ferment soluble, à propriétés oxidantes». *Extrait des Annales de Ch. et de Phys.* 7.^a serie. T. XII, 1897.

(9) Buchner: *Ber. deut. Chem. Ges.* 30, 117; 1.110 (1897).

(10) Linossier: «Contribution à l'étude des ferments oxydants, sur la peroxydase du pus». *C. P. Soc. Biol.* 26 mars. 1898.

(11) O. Loew: «Catalase a new enzyme of general occurrence with special reference to the tobacco plant». *U. S. Dep. of Agric. Report*. Número 68 (1901).

(12) R. Chodat et F. Rouge: «La sychochýmase ou le Lab-ferment du *Ficus carica*». *I. Bot. univ. de Genève*. 1906.

(13) Sörensen: «Etudes enzymatiques». «Sur la mesurè et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques». *C. R. du Lab. de Carlsberg*. Copenhagen, 1909.

(14) Willstätter und Stoll: *Ann. Chem.*, 416, 21, 1918; y Willstätter: «Untersuchungen uber enzyme», 1928.

(15) J. B. Sumner: «Crystalline Urease». *J. of Biol. Chem.* T. LXXVI, núm. 1, pp. 149-162 (1928).

(16) J. Northrop: «Crystalline pepsine. Isolation and test of purity». *J. of Gen. Physiology*, 13, p. 739, 1930.

(17) *Z. Physiol. Chem.*, 192, 171 (1930).

(18) R. Dubos: «Enzymatic analysis of the antigenic structure of pneumococci». *Erg. der Enzymforschung*. T. 8, pp. 135-148.

(19) J. B. Sumner: «Antiurease». *Erg. der Enzymforschung*. T. 6, pp. 201-208.

(20) James B. Sumner: «Enzymes». *Ann. Rev. of Bioch.* Vol. IV, página 41, 1935.

(20 bis) F. Chodat: «Sur l'importance des points isoelectriques dans la preparation et dans l'activité des ferments». *C. R. des seances de la Soc. de Phys. et d'H. Nat. de Genève*. V. 44. N.º I, págs. 35-40 (1927).

(21) O. Fernández y A. Pizarroso: «Fermentos de las semillas oleagi-

- nosas. Lipasas, 2.^a nota». Anal. de la Soc. Esp. de Fís. y Quím. T. XV, 1917.
- (21 bis) Chodat et Rouge: «La sycochymase ou le Labferment du *Ficus carica*». I. Botan. de la Univ. de Genève. 1906.
- (22) G. H. Roger: «Questions actuelles de Biologie Médicale», página 150. 1924.
- (23) R. Fabre: «Les méthodes actuelles de purification des enzymes par adsorption». Bull. de la Soc. de Ch. Biol., págs. 423-48. 1923.
- (24) P. Bernard: «Influence de quelques cations sur l'activité amylo-
litique de la pancréatine». Univ. Toulouse. 1936.
- (25) F. Maignon: C. R. Soc. Biol. T. CIX, 93. 1932.
- (26) Hérissey: C. R. de la Ac. des Sc., 173, 1.406 (1921).
- (27) Ambard: «Fixation de l'amylase par l'amidon cru et l'empois d'amidon». C. R. de la Soc. de Biol. T. 83, pág. 1.458 (1920), y T. 84, página 230 (1921).
- (28) Effront: C. R. de la Soc. de Biol., 86, 271 (1922), y 87, 128 (1922).
- (29) F. Bustinza: «La invertasa y sus aplicaciones». La Farmacia Moderna, 1936.
- (30) W. Grassmann: «Neue methoden und Ergebnisse der Enzymforschung», 1928, y Willstätter: «Untersuchungen über enzyme», 1928.
- (31) Otto Warburg: Chemische Konstitution von Fermenten». 7 B. Ergebnis. der Enzymforsch., pp. 210-245.
- (31 bis) F. G. Fischer: «Niedermolekulare Überträger biologischer Oxido-Reduktionen und ihre Potentiale». Ergeb. der Enzymf. 8 B., páginas 185-216.
- (32) J. Sumner: «Enzymes». An. Rev. of Bioch. Vol. IV, páginas 37-58. 1935.
- (33) Northrop: «Crystalline pepsine. Isolation and test of purity». J. of Gen. Phys. 13, p. 739. 1930.
- (34) Z. Physiol. Chem., 192, 171 (1930).
- (34 bis). Z. Physiol. Chem., 201, 255 (1931).
- (34 ter) Cita del Dr. Grande Covián: «Las Vitaminas». Manuales Ibis. Vol. III, 1942.
- (35) Cita del Prof. Santos: «Algunas relaciones entre Biocatalizadores». An. de la Univ. de Madrid, 1942.
- (36) Véase Prof. Lora: «Modernas orientaciones en química de enzimas». 1942. Cap. VI: «Modelos de enzimas».
- (37) Sörensen: «Etudes enzymatiques». II. «Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions hydrogène dans les réactions enzymatiques». C. R. du Lab. de Carlsberg. 1909.
- (38) O. Fernández: «Los anti fermentos en terapéutica».
- (38 bis) F. Nitti, Mme. Tréfouël, et Mlle. V. Hamon: «Recherches sur le sulfamide et les antisulfamides». A. I. P., p. 9-36, julio 1941.
- (39) Rockwood y Husa: Journ. Amer. Chem. Sec., 45:2678 (1923).
- (40) P. Bernard: «Influence de quelques cations sur l'activité amylo-
litique de la pancréatine». Univ. de Toulouse. 1936.
- (41) Howard Lewis: «The Chemistry and metabolism of the compounds of sulfur». Ann. Rev. of Bioch., p. 149. 1935.
- (42) Pryde: «Recent advances in biochemistry», p. 15. 1931.
- (43) Roger-Binet: «Traité de Physiologie normale et pathologique». Tomo III. «Physiologie du foie et de l'appareil urinaire». 1939.
- (44) H. Tauler: «The interaction of ascorbic acid (vit. C) with enzymes». Ergebn. der Enzymforsch. B. 7. p. 301-305.
- (45) Stepp-Kühnau y Schroeder: «Las vitaminas y su utilización clínica». Edic. Bayer, p. 13.
- (46) O. Fernández: «Quelques points de vue sur la chimie des ferments». Soc. Ch. de France. Junio de 1931.
- (47) Fischer: «Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft». 27, 2085 (1894).

- (48) F. Bustinza: «La invertasa y sus aplicaciones» y «Glucósidos cianogénicos y fermentos que catalizan su hidrólisis», en *La Farmacia Moderna*, 1936.
- (49) Fritz Ziegler: «Los enzimas como elementos esclarecedores de la constitución de los compuestos de elevado índice molecular». *Medicina y Química Bayer*, 1937.
- (50) Karström: *Bioch. Z.* 231, 399 (1931).
- (51) C. L. Lautenschlager: «La investigación de sustancias naturales encauzadas al descubrimiento de medicamentos valiosos». *Medicina y Química Bayer*, 1937.
- (52) O. Fernández: «Bioquímica del cáncer», 1942.
- (53) Croft-Hill: *J. Chem. Soc.*, 73, 634 (1898).
- (54) A. Chalmeta: «Síntesis de glucósidos». Memoria Diputación provincial de Valencia, 1929.
- (55) F. A. Moelwyn Hughes: «The kinetics of enzyme reactions». *Erg. der Enzymforschung*, VI B, p. 23-46.
- (56) F. Bustinza: «Catalasa y sus aplicaciones». *Rev. Ac. de Ciencias de Madrid*, t. XXVIII.
- (56 bis) Szent-Györgyi: «Studies on Biological Oxydation». Muy bien resumido en el libro del Prof. Lora «Modernas orientaciones en Química de Enzimas», p. 36 a 40.
- (57) Niessen: *Z. Klin. Med.*, 92, 304 (1921).
- (58) Waldschmidt-Leitz: *Zeit. Phys. Chem* (1934), 216, 161 y 218-142. Cita del Prof. O. Fernández en *Bioquímica del cáncer*.
- (59) Ottenstein-Pastinsky: *Zeit Krebsforsch*, 1935, 42. Cita del profesor O. Fernández en *Bioquímica del cáncer*.
- (60) Marchionini-Ottenstein: *Dtsch. Z. Nervenheil Kunde*, 132, 222 (1933).
- (61) Habelmann: «Las variaciones del contenido en oxidasas de los leucocitos en narcosis y operaciones».
- (62) Dato que amablemente me ha facilitado el ilustre pediatra doctor don Juan de Dios Ugarte, discípulo del Prof. Marfán.
- (63) L. Persico: «Contribución al estudio cultural del gonococo». Tesis Dr. Univ. de Buenos Aires, 1940.
- (64) Zeller: «Dosificación del amoniaco como prueba para el diagnóstico del embarazo». *Klin. Wschr.* núm. 9, p. 220, 1941 (su resumen en *Rev. de Rev.* 2, p. 130).
- (65) Camilo Arton: «Fat metabolism». *Ann. Rev. of Bioch.* p. 209, 1935.
- (66) Dr. Grande Covián: «Über das Vorkommen von Palmitico und Stearicodhydrogenasen in einigen Pflanzensamen». Sonderabdruck aus dem *Skandinavischen Archiv. fur physiologie*, Band LXIX, p. 190-196, 1934.
- (67) Waldschmidt-Leitz: «Enzymes». *Ann. Rev. of Bioch.* p. 39-58, 1934.
- (68) Fiessinger: *Gajdos. Ann. Méd.*, 38 (1935).
- (69) Prof. Roger: «Physiologie du foie et de l'appareil urinaire». Tomo III, p. 234, de «Physiologie normale et Pathologique».
- (70) Friess-Hallay: *Z. Klin. Med.*, 113, 275 (1930).
- (71) Gattron, Petow, Schreiber: *Dermatol. Z.*, 39, 89 (1923).
- (72) Jorns: *Arch. Klin. Chiv.*, 172, 781 (1933).
- (73) D'Ignazio: *Fisiol. e Med.*, 3, 259 (1932).
- (74) Bernhard: *Z. Krebsforsch*, 38, 450 (1933).
- (75) Zorn: *Fermentforsch*, 15, 397 (1938).
- (76) Kanócz: *Z. Tuberc.*, 63, 113 (1932).
- (77) J. H. Gaddum: «Choline and allied substances». *Ann. Rev. of Bioch.* p. 311-330 (1935).
- (78) Verebely: *Klin. Wschr.*, 851, 1937.
- (79) Antopol, Tuchman, Chifrin: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. (Am.)*, 36, 46 (1937).

(80) A. Zeller: «Fisiología y patología de los fermentos en el organismo femenino». Schw Med. Wschr., 15, III, 1941 (su resumen en Rev. de Rev., núm. 11, p. 324).

(81) Suzuki, Yoshimura y Takaiishi: Imp. Univ. College Agric. Bull. Tokio, 7, 503 (1907).

(82) Folley and Kay: Physiol. Rev., 12, 384 (1932).

(83) Jenner and Kay: Brit. J. Exp. Path., 13, 22 (1932).

(84) Robison R.: «The possible significance of hexophosphoric esters in ossification». Bich J. T. 17, 286-293 (1923).

(84 bis) Prof. Lora Tamayo: «La Bioquímica de la osificación». Discurso de ingreso en la Academia de Medicina de Sevilla, 1936. M. Lora Tamayo y Fr. Segovía: Investigaciones sobre fosfatasas. I. Modo de acción de las fosfatasas de origen óseo. An. Soc. Esp. de Física y Química. Marzo de 1936. Lora Tamayo y J. Rodríguez Blanco: «Inv. sobre fosfatasas». II. Nueva preparación de una fosfatasa de origen óseo. An. Soc. Esp. de Física y Química. 1936.

(85) Köhler: Erg. der Enzymforsch, 157 (1937).

(86) Dmochowski: «Sur les phosphatases de l'urine». C. R. Soc. Biol. T. 113, p. 956, 1933.

(87) Wolbergs: Hoppe-Zeylers Z., 238, 23 (1936).

(88) Cita del Prof. Santos: «Algunas relaciones entre biocatalizadores». Anales Univ. Madrid 1942.

(89) Kutscher. Naturwiss, 558 (1935).

(90) Journal Dairy Research, 5, 54 (1933).

(91) Rousseau: «L'activité fermentaire de la phosphodiastase du venin de cobra en solution aqueuse après chauffage à 70°». C. R. Soc. Biol. Tomo CXVII, p. 565 (1934).

(92) J. Pascal: «Action de quelques antiseptiques et de la Lysocithine sur la morphologie et la cytologie du Streptocoque». Tes. Dr. Univ. Paris, 1938.

(93) Wohlgemuth: Bioch. Z., 2, 1 (1908).

(94) Baumann: Klin. Wschr, 982 (1929).

(95) Bouitroux et Branisteau: «Contribución al estudio de la eliminación de la amilasa urinaria en diversos casos normales y patológicos». Su resumen en Med. Ibero, 2 dic., 1933.

(96) Brinck y Rodríguez Ollerós: «Sobre la pancreatitis ligera evolutiva como consecuencia de enfermedades de las vías biliares y duodenal». Med. Int., dic., 1932.

(97) Dr. Rodríguez Ollerós: «Sobre las variaciones de la amilasa tras el choc histamínico peptónico». Med. Ibero, 25 marzo 1933.

(98) Delhogue: Klin. Wschr, 2437 (1936).

(99) Marchionin-Ottenstén: Klin. Wschr, 1345, 1424 (1932).

(100) Dr. Rodríguez Ollerós: «Consideraciones sobre algunos modernos tratamientos no insulínicos de la diabetes». La Med. Ibero, 14, 1 (1933).

(101) R. Cortesi: «Contribution à l'étude de l'enzyme. Son application au titrage de la pepsine». 1938.

(102) Delhogue: D. Arch. Klin. Med., 157 (1927), 299, y Arch. Verdgs. Krkh., 45 294 (1929).

(103) Peczenik: Fermentforschung, 9 (1928), 166.

(104) Baumann: Z. exp. Med., 91 (1933), 120.

(105) F. Moceroa: «Fermentos probióticos de los jugos pancreático e intestinal y de las glándulas que los segregan». 1934. Ts. Dr. Farm.

(106) Grassmann-Heyde: Hoppe-Seylers, Z., 188, 69 (1930).

(107) Böhmig: Wien. Arch. inn. Med., 19 (1930), 89.

(108) Prof. Velázquez: «Terapéutica con sus fundamentos de Farmacología Experimental». 1942.

(109) Gastón Ramón, Mlle. Germain Moureaux et Pechon: «Sur un nouveau milieu de culture pour l'obtention des toxines microbiennes. Appli-

cation à la production de toxine diphtérique et de la toxine staphylococcique en vue de la préparation des anatoxines correspondantes». C. R. Ac. des Ss. seance 8 déc. 1941.

- (110) Robbins Lamson: J. Biol. Chem., 106, 725 (1934).
 (112) Fischer: Bioch. Z., 264, 169 (1933).
 (113) Lasch: Klin. Wschr., 810 (1937).
 (114) Berger, Hartmann u Leubner: Klin. Wschr., 490 (1935); Wien y en Arch. inn. Med., 28, 211 (1936).
 (115) Datos tomados de Amnon y Chytrek en Ergebnisse der Enzymforschung, 8 B., p. 118, 1939.
 (116) Me he inspirado para este tema en la obra de Brocq «Les pancreatites aiguës chirurgicales», 1926.
 (117) Sabrazès, Parcelier et Bonnin: «Lombricose du canal de Wirsung. Pancréatite hemorrhagique». Ann. de Anat. pathol. Med. chir. T. II, núm. 5, p. 385-412, 1925.
 ... (118) Hymán Miller, Roland C. Hawes and George Pines: «Histaminase a study of ist effects on skin reactivity to histamine and to allergens». The J. of allergy, 335-346 (may 1941).
 (119) Marcou: «Sur le rôle physiologique de l'histamine». La Presse médicale, núm. 20, p. 371, 1938.
 (120) Ann. Merck., p. 234, 1941.
 (121) Reitler: Schweiz Med. Wschr., núm. 4, p. 74, 1940.
 (122) Krebs y Henseleit: «Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper». Zeits. f. Phys Chem. T. CCX, p. 33-66, 1932.
 (123) Haddow: Lancet, 1,021 (1931).
 (124) Ottenstein: Z. Exp. Med., 87, 200 (1933).
 (125) Marchionini: Dtsch. Z. Nervenheilk., 134, 231 (1934).
 (126) R. Chodat: «Principes de Botanique», p. 107, 1920.
 (127) F. Bustinza: «Sobre los fermentos del Sterigmatocystis Acinae Uvae». Caballero=Aspergillus carbonarius (Bainier). Thom. Bol. Soc. Esp. de H. Nat. T. XXXI, p. 521-527 (1931).
 (128) S. R. Bose: «Enzymes of wood rotting fungi». Ergebnis. der Enzymforsch, B. 8, p. 267-276.
 (129) Lutz: C. R. Ac. Sc., 190, 892, Paris 1930.
 (130) M. Stephenson: «The chemistry of bacteria». Ann. Rev. of Bioch., 593-614 (1935).
 (131) Bessey and King: J. Infectious diseases, 54, 123 (1934).
 (132) Burk-Linewearer-Horner: J. Bact., 27, 325 (1934).
 (133) Virtanen-Tarnanen: Bioch. Z., 250, 193 (1932).
 (134) Green-Stickland: Bioch. J., 28, 898 (1934).
 (135) M. Stephenson: «The Chemistry of bacteria». Ann. Rev. of Bioch., 519-534 (1934).
 (136) M. Stephenson: «The Chemistry of bacteria». Ann. Rev. of Bioch., 593-614 (1935).
 (137) F. Bustinza: «La catalasa y sus aplicaciones». Rev. Ac. de Ciencias. T. XXVIII. Véanse las capítulos de Bacteriocatalasa y microbiolisis, Catalasa y diagnóstico bacteriano y Examen higiénico de la leche y catalasimetría de la leche.
 (138) Stapp: «Beitragé zum studium der Bakterientyrosinase». Bioch. Zeits., 141, 42-69; cita de D. Juan Rodríguez Sardiña en «La grasa de las judías debida a Bacterium medicaginis var. phaseolicola en España.
 (139) G. Dáddi: «Il bacilo de Koch». Bologna, 1938.
 (140) F. Bustinza: «Sobre la reacción de Yoshida». Rev. Ac. de Farmacia, 1941.
 (141) René Dubos «Enzymatic analysis of the Antigenic structure of pneumocicci». Erg. der Enzymforsch. T. 8, p. 135-148.
 (142) J. Marrack: «Immunochemistry and its relation to enzymes». Erg. der Enzymforsch. 7, B., p. 281-300, 1938.

- (143) J. Sumner: «Antiurease». *Erg. der Enzymforsch.* T. 6, p. 201-208.
- (144) Prof. Emil Abderhalden: «Abwehrfermente». *Erg. der Enzymforsch.* Band VI, p. 189-200, 1937.
- (145) R. Abderhalden: «Importance des ferments de défense pour la clinique et l'expérimentation». *La Presse Médicale*, feb. 1942.
- (146) Dr. Agase Lafont: «Interferometría y diagnóstico de los tumores», publicado en *Clinique et Laboratoire*. Edición española.
- (147) Dr. Durupt: «L'interférométrie et l'endocrinologie», publicado en *Le Phare Médical*, de Paris.
- (147 bis) J. Lucas Gallego: «Tesis doctoral». F. de Medicina de Madrid. 1942. C. Gil, A. Santos Ruiz y Lucas Gallego: «Sobre el diagnóstico precoz del cáncer». (Diversas comunicaciones en prensa), 1942.
- (148) Mario Raspi: «L'enzymoréaction pour le lait dans l'étude du pouvoír digestif du nourrisson». *Le Nourrisson*, juillet 1928. Su resumen lo he consultado en *Le Lait*, p. 649, 1929.
- (149) Bourquelot-Hérissey: «Sur un glucoside nouveau, l'aucubine, retiré des graines d'Aucuba Japonica». *C. R. Ac. Sc.*, 134, 1441, 1902.
- (150) L. Bourdier: «Sur la présence de l'aucubine dans différents espèces du genre *Plantago*». *J. de Ph. et de Ch.*, 6-26, 254 (1907).
- (151) A. Senglet «La melanogenèse chez quelques plantes d'un intérêt pharmaceutique». *Bull. Soc. Bot. de Genève*. Vol. XX.
- (152) Bræcke: «L'aucubine dans les espèces de *Rhinanthus* et de *Melampyrum* et sa recherche dans quelques *Scrofuliaracées*». Thèse Univ. Paris 1923-24.
- (153) Brevière: «Localisation de l'arbutoside dans la gesse noire». *Orubus niger* L = *Lathyrus niger* Bernh. 1935.
- (154) Bridel: «Etude biochimique sur la composition du *Monotropia hypopitys* L. Obtention d'un nouveau glucoside à salicylate de méthyle, la monotropitine». *C. R. Ac. Sc. de Paris*, 177, p. 642 (1923).
- (155) Bourquelot-Hérissey: «Sur l'origine et la composition de l'essence de Benoîte, glucoside et enzyme nouveaux». *J. de Ph. et de Ch.* (6), 21, 481 (1905).
- (156) Hérissey-Cheymol: «Extraction et propriétés de la géine, glucoside générateur d'eugenol contenu dans le *Geum urbanum*». *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 7, 499 (1925).
- (157) Bourquelot-Hérissey: «Presence dans le Melilot et l'*Asperule* odorante des glucosides fournissant de la coumarine, sous l'action hydrolysante de l'emulsine». *J. de Ph. et de Ch.* (7), XXII, p. 289 (1920).
- (158) P. Delaunay: «Contribution à l'étude des glucosides de la famille des orchidées». Thèse, 1923.
- (159) M. Mirande: «Influence exercée par certains vapeurs sur la cyanogénese végétale. Procéde rapide pour la recherche des plantes à acide cyanhydrique». *C. R. Ac. des Sc. de Paris*, 149, p. 140-142, 1909.
- (160) L. Guignard: «Influence de l'anesthésie et du gel sur la dédoublement de certains glucosides chez les plantes». *C. R. Ac. Sc. de Paris*, 149, p. 91-93 (1909).
- (161) E. Perrot et A. Goris: «La stérilisation des plantes médicinales dans ses rapports avec leur activité thérapeutique». *Bull. des Sc. Pharmaceutiques*, núm. 7 (1909).
- (162) Más-Guindal y Panadero: «La estabilización de los vegetales en Farmacia. Fundamentos, procedimientos y aplicaciones». Ibérica. Tortosa, 1925.
- (163) H. Golaz: «Extraits fluides dialysés préparés avec les plantes fraîches cueillies au moment de la floraison ou de la maturité». *J. Suisse de Ph. et de Ch.* XXXII, p. 372-375 (1895).
- (164) R. Chodat: «Ferments et Médicaments». *Journal Suisse de Pharmacie*, 1919.
- (165) A. Senglet: «La melanogénese II. Le noircissement du mate et

le rôle du sapecage sur la feuille fraîche». Bull. Soc. Bot. de Genève. Volumen XX.

(166) Huguier: «Les intoxications alimentaires des animaux de la ferme». La Vie Agricole et Rurale, p. 138, 26 ag. 1928.

(167) F. Bustinza: «Glucósidos cianogenéticos y fermentos que catalizan su hidrólisis». La Farmacia Moderna, 1936.

(168) A. Gam'r: «Notas sobre estabilización y cultivo de la bardana, digital y belladona». Ac. de Medicina de Valencia, 1935.

(169) W. Withering: «An account of the Fox-glove and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy and other diseases». 1785.

(170) Cloetta: Archiv. expt. Path. Pharmacol., 88, 113 (1920).

(171) Jacobs and Hoffmann: J. Biol. Chem., 69, 153 (1926).

(172) A. Stoll, Jany Renz und W. Kreis: «K-Strophantoxid, das Hapt-glucosid der samen von Str. Kombé». Helvetica Chimica Acta. Vol. XX. Fasc. 6.º

(173) Prof. Lendle: «Digitalis Körper und verwandte herzwirksame glykoside (Digitaloide), 1935, en Handbuch der experimentellen pharmakologie de Heubner und Schüller.

(174) Prof. Arthur Stoll: «The cardiac glycosides». The Pharmaceutical Press. London 1937.

(175) A. Stoll, W. Kreis und A. Hofman: Z. Physiol. Chem., 222, 24 (1933).

(176) Prof. A. Stoll: «Szillarenase, Digilanidase, Digipurpidase, Strofantobiase», en Die Methoden der Férmentforschung, p. 1800-1817 (1940).

I N D I C E

	Págs.
Algunos datos históricos.....	6
Preparación de las enzimas.....	12
Naturaleza química de las enzimas.....	14
Activadores e inhibidores.....	21
Especificidad	27
Reversibilidad de las acciones diastásicas.....	29
Ley de acción.....	30
Clasificación.....	31
Catalasa.....	32
Oxidasa y Peroxidasa.....	33
Diamino-oxidasa	36
Lipasas	36
Colinesterasa.....	39
Fosfatasa.....	40
Lecitinasas.....	44
Amilasas.....	45
Fermentos proteolíticos: pepsina, tripsina, peptidasas, cuajo animal, cuajo vegetal, proteasas vegetales, fermento coagulante de la sangre.....	49
La hemogenasa y la anemia perniciosa.....	55
Investigación de fermentos en el jugo duodenal	56
El drama pancreático y los fermentos.....	57
Histaminasa.....	58
Arginasa.....	59
Los fermentos en los hongos.....	60
Las bacterias y los fermentos.....	61
Los fermentos y la estructura antigénica de los neurococos.....	63
Antifermentos.....	65
Fermentos de defensa.....	67
Los fermentos y la estabilización de drogas.....	71
Los glucósidos cardiotónicos y los fermentos.....	77
Bibliografía.....	87

CONTESTACION DEL ACADEMICO DE NUMERO DON ANGEL SANTOS RUIZ

EXCELENTÍSIMO SEÑOR PRESIDENTE,
SEÑORES ACADÉMICOS:

Para mí es un agradable y sencillo deber el presentar al nuevo compañero de Academia, don Florencio Bustinza Lachiondo. Grato, por ser amigo y hombre bueno; fácil, por su personalidad tan acusada y valía científica extraordinaria. Perdonad, por tanto, que el protocolo me obligue a hacer el balance de sus méritos, que para muchos de vosotros son harto conocidos y apreciados.

El recipiendario es doctor en Ciencias Naturales y doctor en Farmacia, con premio extraordinario en ambos grados.

Ha sido catedrático por oposición del Instituto de Salamanca, de donde pasó por permuta al Instituto de Oviedo, de cuya Facultad de Ciencias fué auxiliar de Biología y Geología.

En 1930 ganó por oposición la cátedra de Agricultura del Instituto del Cardenal Cisneros de Madrid, Centro donde ha desarrollado una intensa labor docente, creando y organizando un espléndido Laboratorio de Agricultura y Tecnología Industrial.

Su entusiasmo y sus desvelos en defensa de la necesidad de la disciplina de Agricultura y Tecnología Industrial en el bachillerato están bien patentes en su interesante folleto *La técnica agrícola e industrial y la economía en los estudios del bachillerato*, publicado en abril de 1936, y en el cual se refleja su intensa labor cultural, así como su ferviente defensa de la necesidad de despertar en las juventudes escolares el cariño al campo y al labrador, al obrero industrial, al técnico, al investigador y a los creadores de trabajo, todos ellos puntales de la prosperidad nacional. En el prólogo de su obra *Elementos de Agricultura, Técnica Industrial y Economía*, Madrid, septiembre de 1935, hemos leído las siguientes frases: "Es nuestra ilusión contribuir a formar un pueblo educado en los problemas de la Agricultura, de la Industria y de la Economía, para elevar a nuestra Agricultura e Industria al rango que se merecen y hacer de nuestra Patria un país rico y próspero, en el que esté garantizado el bienestar material y espiritual de todos los españoles."

Desde hace quince años viene dedicándose a la Fisiología vegetal, cultivando principalmente las ramas de Fitoquímica y Fermentos de las plantas.

En el año 1927 fué pensionado para estudiar con el profesor Robert Chodat, director del Instituto Botánico de la Universidad de Ginebra, con quien siguió dos cursos de Fisiología vegetal, el curso de Fermentos y fermentaciones y el de Microbiología aplicada. En junio de 1928 presentó, apadrinado por el profesor Dr. Robert Chodat, una comunicación a la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève: *Sur la pseudoperoxydase, un nouveau ferment oxydant indirect, agissant sur le maïsen du peroxyde d'hydrogène.*

Este fué su primer trabajo de investigación, y a partir de dicho momento hasta el presente sus trabajos han venido publicándose en las revistas de la Real Academia de Ciencias, *Bulletin de la Société de Botanique de Genève*, *Anales de Física y Química*, *Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural*, *Revista de Institutos* y *La Farmacia Moderna*.

He aquí una relación sucinta:

"Contribution à l'étude des ferments du *Cyperus esculentus*".—*L. Bulletin de la Société Botanique de Genève*, V, 21 année, 1929.

"Contribución al estudio bioquímico de la chufa".—*Rev. de la R. A. de Ciencias de Madrid*, t. XXIV, 9.º de la segunda serie, 1929.

"La catalasa y sus aplicaciones".—*Rev. de la R. A. de Ciencias de Madrid*, t. XXVIII, 13 de la segunda serie.

"Catalasa y poder germinativo de las semillas".—*Rev. de la R. S. E. de Historia Natural*, t. XXIX, 1929, págs. 227-30.

"Contribución al estudio Químico-Fisiológico de las Esencias".—*Memorias de la R. S. Española de Historia Natural*, t. XV, 1929.

"Sobre la constitución química de los taninos y su papel fisiológico".—*Conferencias y reseñas científicas de la R. S. E. de Historia Natural*, t. IV, núm. 2, 1929.

"Contribución al estudio de la distribución de la catalasa en las plantas".—*Boletín de la R. S. E. de Historia Natural*, t. XXX, 1930.

"Sobre los fermentos del *Sterigmatocistis acynae uvae*".—*Boletín R. S. E. de Historia Natural*, t. XXXI, 1931.

"Presencia de Tirosinasa, Oxidasa y Catalasa en las raíces de la *Inula helenium*, *Achilea Santolinoides* y *Ach. millefolium*".—*Reseñas Científicas de la Sdad. Esp. de Historia Natural*, t. VI, págs. 27-32, 1931.

"Urea y ureasa en los seres vivos".—*Reseñas científicas de la Sociedad Esp. de Historia Natural*, t. VI, 1931.

"Luz Solar, Rayos ultravioleta, Vitamina D, Ergosterol y Medicación antirraquítica".—*La Farmacia Moderna*, 1929.

"Importancia del examen Higiénico de la leche y Catalasimetría de la leche".—*La Farmacia Moderna*, 1929.

"Sobre los fermentos de la Ovomaltina".—*La Farmacia Moderna*, 1931.

"Contribución al estudio analítico del *Cicer arietinum*, L. var. album. y fuscum.—*An. de la Sdad. Esp. de F. y Quím.*, t. XXX, páginas 673-678, 1932, en col. con el profesor Rius.

"La Invertasa y sus aplicaciones".—*Rev. de Institutos*, mayo y junio 1935.

"Glucósidos Cianogenéticos y fermentos que catalizan su Hidrólisis".—*Rev. de Institutos*, enero y febrero de 1935.

En marzo de 1941 'dió a conocer en esta Real Academia de Farmacia la reacción de Yoshida para el diagnóstico de la tuberculosis.

Ha publicado también los artículos de divulgación científica y otros en defensa de la repoblación forestal que incluimos a continuación:

"La glosopeda, o fiebre aftosa".—En *El Carbayón*, de Oviedo, 4-12-92.

"Diálogo entre el yeso y el carbonato potásico".—*La Farmacia Moderna*, 25-XII-28.

"Fabricación del pan por panificación directa".—*La Farmacia Moderna*, 10-XII-32.

"Sobre las virtudes medicinales del limón".—*Tajo*, 1.º marzo 1941.

"La Técnica Agrícola e Industrial y la Economía en los estudios del bachillerato".—*Rev. de Institutos*, marzo 1936.

"La repoblación forestal".—En *La Gaceta del Norte*, 17-III-38 y 20-III-38.

Imperdonable olvido sería no mencionar sus excelentes obras didácticas, declaradas de mérito por la Real Academia de Ciencias:

"Elementos de Técnica Industrial". La Academia comunicó dicho acuerdo al ministerio de I. P. con fecha del 28 de junio de 1932.

"Agricultura e Industrias agrícolas". El Ilmo. Sr. Sub. de I. P. comunicó el acuerdo de la R. Ac. al Sr. Director del Instituto del Cardenal Cisneros, con fecha de 4 de mayo de 1934.

"Elementos de Agricultura, Técnica Industrial y Economía". El Ilmo. Sr. Director general de Enseñanza Sup. y Media comunicó, con fecha de 29 de febrero de 1941, al Sr. Director del Inst. Cardenal Cisneros el acuerdo de la R. A. de Ciencias, de Madrid.

Su trabajo más reciente se ha publicado en los *Anales del Jardín Botánico*, "Contribución al estudio de las aplicaciones de los fermentos del *Cyperus esculentus*", y en él da cuenta de una nueva reacción para descubrir el agua oxigenada en la leche y el ácido fénico en las vacunas.

Las múltiples referencias del erudito discurso del Dr. Bustinza a las bacterias y al diagnóstico obedecen a que también ha orientado sus actividades hacia los análisis clínicos.

En el grupo de ergonas que presiden la vida celular figuran los fermentos, biocatalizadores imprescindibles para el mantenimiento de

la vida, la cual puede considerarse como una sucesión encadenada de reacciones enzimáticas. Pero no solamente en este aspecto del mecanismo interno vital hemos de tener en cuenta a los fermentos y considerar su extraordinaria importancia, que tan magistralmente nos ha expuesto el Dr. Bustinza, sino desde otros puntos de vista que, como el industrial, ofrece su estudio enorme interés.

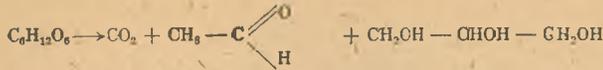
En un sentido amplio, todas las industrias relacionadas con materias procedentes de organismos vivos envuelven en su desarrollo procesos enzimáticos. Tal podríamos decir de la producción de leche, de la seda, del algodón, de la lana, pero en un sentido bioquímico más real y limitado hablaremos de fermentos e industria cuando las condiciones de la vida animal o vegetal se controlen o varíen experimentalmente para producir o incrementar el rendimiento en materiales de importancia económica.

Los compuestos orgánicos preparados por las reacciones enzimáticas de plantas y animales cuesta mucho menos que cuando se utilizan procedimientos sintéticos, según puntualiza Pope. El organismo viviente utiliza la energía solar, de ahí que la aportación intensa de tales métodos dé lugar a un mayor rendimiento. Existe, evidentemente, una diferencia entre los métodos de síntesis química y la manera peculiar cómo los seres vivos fabrican sus constituyentes. Esta diferencia no es más que secundaria, ya que hoy día, y cada vez más, la química industrial tiende a copiar los procedimientos biológicos y emplear de un modo sistemático los catalizadores, verdaderos fermentos industriales.

Permitidme que repita mis palabras de una conferencia, en la que decía así:

“El químico moderno debe tener conocimientos claros, ya que no profundos, de bioquímica. Es obvio decir cuán deseable y conveniente sería para España que nuestros químicos orgánicos tomasen contacto más estrecho con las cosas de la biología. Interesa que la Química orgánica mire a sus propios orígenes. Queda todo un mundo por explorar y descubrir, y los hechos pueden estar llenos de consecuencias importantes. El químico no debe encerrarse en una torre de marfil y mirar horizontes por un solo hueco, sino observarle en todos sus aspectos.”

Pasteur, en 1857, estudió los fenómenos químicos que tienen lugar en la fermentación alcohólica y observó que, además del alcohol, la levadura produce una pequeña cantidad de glicerina, a razón del 3,6 por 100 del azúcar fermentado. Al faltár a los alemanes las materias grasas en la guerra del 14, renovaron los trabajos de Pasteur y encontraron el medio para aumentar la producción de glicerina en la fermentación alcohólica, logrando, en presencia del sulfito sódico, pasar de 3,6 por 100 al 30 por 100, rendimiento que es industrial:



Hoy, la industria utiliza los fermentos para sus designios con amplitud. Las industrias dietéticas, agrícolas, químicas, farmacéuticas, etc., sacian su sed de mejora en el manantial inagotable de la Enzimología.

La distinción entre fermentos figurados y no figurados ha perdido significación desde que Büchner logró aislar de la levadura de cerveza un jugo (zimasa) que posee sus mismas propiedades. A pesar de ello, y dada la dificultad de obtención de algunos fermentos, se establece una cierta separación entre los enzimas endocelulares (desmoenzimas) y los exocelulares (lioenzimas). Los enzimas son producidos por los organismos, y tanto en la materia viviente como fuera de ella actúan de la misma manera, produciendo las denominadas fermentaciones. Son estos endofermentos los más empleados en las diversas industrias. Brevemente indicaremos algunas de ellas.

El ácido láctico le producen los enzimas de una gran variedad de bacterias, muchas levaduras, hongos y algunas plantas. El más usado comercialmente es un cultivo puro de *Bacterium Delbrucki* (Leichmann). El material sobre el que actúa el fermento consiste en sustancias que contengan glúcidos directamente fermentescibles o que puedan transformarse en ellos. En Alemania emplean principalmente fécula de patata, y en EE. UU., melazas de caña de azúcar, almidón, etcétera.

Los almidones se hidrolizan por ebullición con ácidos diluidos o por tratamientos con amilasas. Hay que tener en cuenta en este tipo de fabricación que un exceso de ácido es perjudicial y debe ser neutralizado.

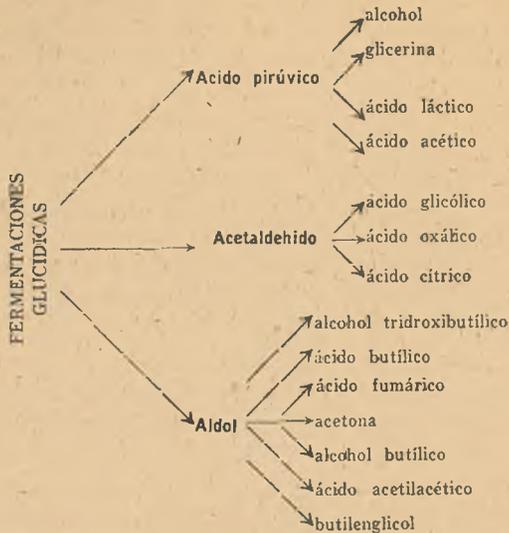
A su vez, logrado el ácido láctico, éste es la base de numerosas industrias derivadas, como la de los cueros, tintes, producción de lactato de etilo (disolvente de la nitrocelulosa), etc.

El ácido láctico presenta interés en la alimentación, sobre todo en ciertos pueblos, como los balcánicos, tan aficionados al Yogourt. Los del Norte y Este de Europa consumen grandes cantidades de berza ácida en fermentación láctica (*choucroute*). También se utiliza en bebidas suaves, confites y en la preparación de alimentos conservados.

Los alimentos fermentados son muy numerosos, no solamente el vino, que proviene de la fermentación del azúcar de la uva, sino otros más corrientes y poco menos que indispensables, tales como el pan. El pan sufre una fermentación por la acción de la levadura y se forma CO₂, que hace elevar la masa, y este gas, aprisionado, produce la característica porosidad.

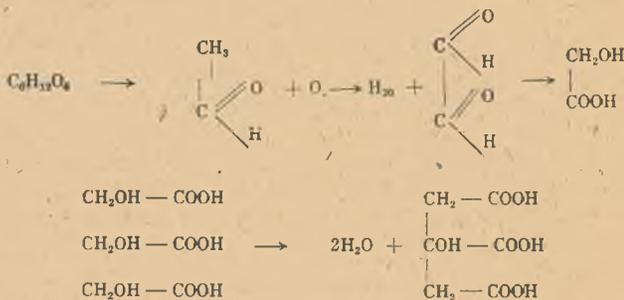
En las fermentaciones glucídicas por detenciones adecuadas o des-

viaciones provocadas por adición de sustancias extrañas es posible aislar numerosos productos. El ácido pirúvico, el acetaldehído y el alcohol son las tres pasarelas químicas:



Vemos, por tanto, la posibilidad de obtener mediante las glucídicas sustancias como alcohol, glicerina, ácido láctico, ácido acético, acetona, ácido cítrico, etc.

En el ácido cítrico se observa la formación de un verdadero producto de síntesis:



noción nueva en franca oposición con el antiguo dogma: Fermentación = degradación.

En la manufactura de mantequilla sintética, las grasas empleadas son perfectamente insaboras e inodoras, y para darlas un aroma y sabor adecuado es necesario introducir en las grasas fundidas un cultivo de ciertas bacterias en leche purísima.

Por el uso de cultivos de hongos es posible obtener en pocos días, a partir de un café verde, un buen café semejante al de Java.

En la preparación del cacao, el fruto (que contiene de 25 a 40 semillas, rodeadas por una pulpa mucilaginoso dulce) se rompe y se fermenta en cubas. Las semillas mejoran así por hidrólisis de algunos de sus constituyentes amargos y por pérdida de la materia mineral de la pulpa.

En la preparación de mermeladas se emplean mucho las pectinas, que se producen en gran cantidad en la fabricación del vinagre y sidra, en la manufactura de ácido cítrico y productos cítricos y en la del azúcar. También se consiguen directamente de zanahoria por extracción con ácidos orgánicos, tales como cítrico, tartárico, láctico y málico. Así obtenida, tiene como impureza almidón y proteínas, que deben separarse para producir jaleas claras. Puede emplearse para esta purificación el *Aspergillus flavus oryzae* (Oshima y Church).

La invertasa se utiliza en la inversión parcial de la sacarosa de los productos alimenticios que la contienen y para la preparación de jarabes. Se ha usado comercialmente en considerable cantidad en Canadá, Australia y EE. UU.

Cristoph descubrió el hongo productor de una fermentación secundaria de la cerveza negra de Baviera, el cual, en medio semejante al de la cerveza, produce solamente pequeñas cantidades de alcohol y gas y da lugar a un compuesto de intenso olor a plátano, que puede ser empleado ventajosamente en la fabricación de aguas minerales, frutas, vinos, etc.

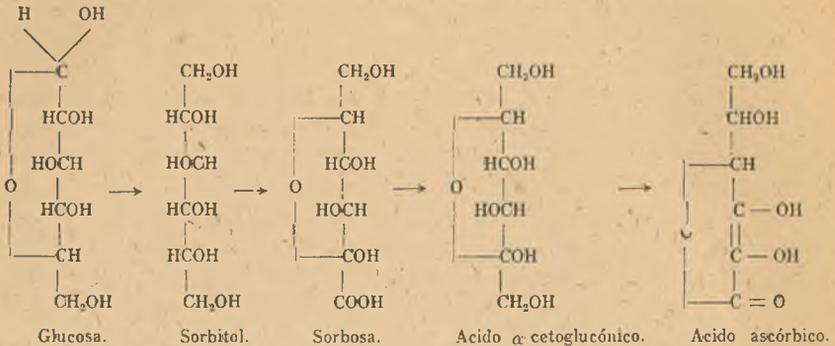
Los alemanes descubrieron en la guerra del 14 que los proteídos pueden sintetizarse a partir de nitrógeno inorgánico y azúcares sencillos, y se han llegado a emplear en gran escala.

Para la preparación como alimento de la secreción de las glándulas mamarias de los animales se emplean en gran escala diferentes reacciones enzimáticas. El procedimiento más importante es la obtención del queso. Se utiliza, o bien el fermento lab (cuajo artificial), obtenido del estómago de ternera, o el que tiene la misma leche (cuajo natural). Pero en la obtención del queso y de la manteca se requiere un cierto grado de acidez, producido por la fermentación de la lactosa. La leche se pasteuriza para destruir microorganismos dañinos.

En la industria textil se emplean también las glucidasas. Los preparados enzimáticos son extractos de malta (Diastafor, Diastasa L., Maltofermento), de páncreas (Degomma, Novofermasol) y de bacterias (Biolasa, Rapidasa). Para la limpieza de tejidos se utilizan unas mezclas de amilasas, protidasas y lipasas, que existen en el comercio con el nombre de Burnun.

Ciertas síntesis industriales, aparentemente químicas, por ejemplo, la fabricación de ácido ascórbico (Reichstein) (en Basilea se produce

una tonelada mensual), tiene una base fermentativa, ya que es necesario para llegar a la sorbosa la acción del *bacterium xilyum* sobre el sorbitol, que a su vez se ha conseguido a partir de glucosa:



El *Thiobacillus thio-oxidans* es el microorganismo oxidante del azufre por excelencia. Suelos deficientes de sulfato son fácilmente suministrados de esta sustancia mediante adición de una mezcla de sulfuros y estas bacterias. Suelos impermeables se transforman en otros ricos en sales solubles por este procedimiento.

En la manufactura de la seda, la separación de cápa protectora de la sericina, sin daño para la fibra, se logra fácilmente con ciertos fermentos, tales como la tripsina y pepsina, en solución débilmente alcalina o ácida, respectivamente.

La paja fermentada anaerobióticamente en presencia de carbonato cálcico convierte la celulosa, galactanas y lignina, en metano. El 34 por 100 del valor calorífico de la paja puede, por tanto, ser obtenido en forma gaseosa combustible. Este proceso ha sido usado en pequeña escala para propósitos de alumbrado. En medio aerobio se transforma la paja en humus, base de la producción de estiércoles.

En agricultura, el ensilado de los piensos consiste en la conservación del alimento verde en otro que permite su almacenamiento durante largos períodos, para lo cual fermentan hasta que se produce una determinada cantidad de ácido acético.

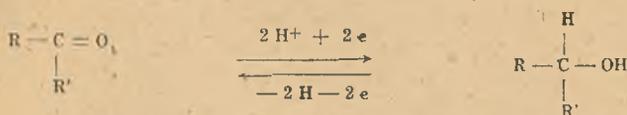
Otros procesos enzimáticos se utilizan en la preparación del tabaco, lino, índigo, etc., algunos de los cuales, como el de la preparación del cuero a partir de pieles animales, se remonta a los tiempos primeros de obtención de este material.

Hace mucho tiempo que se hizo la observación de que el aceite extraído de las semillas oleaginosas, por prensado, experimentaba al propio tiempo un desdoblamiento hidrolítico espontáneo, escindiéndose en glicerina y ácidos grasos. La causa de esta escisión es debida a la actividad de las lipasas que se encuentran en gran número de se-

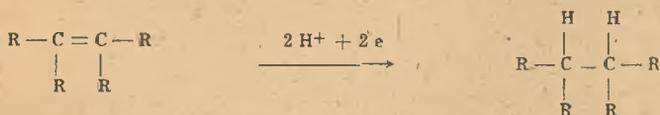
millas (avena, maíz, pimienta negra, kola) y especialmente en la si-
miente del ricino y en las "tortas" de las prensas.

De las reacciones en que intervienen fermentos desmolíticos, el
número de tipos de óxidorreducciones bioquímicas que se pueden em-
plear con fines preparativos no es grande. Se pueden reducir a cua-
tro tipos:

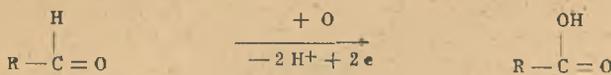
a) El utilizado más á menudo, el más conocido y el más accesi-
ble, desde el punto de vista preparativo, es la reducción de aldehidos
y cetonas a los correspondientes alcoholes, o la reacción inversa, des-
hidratación de los alcoholes primarios o secundarios a las correspon-
dientes combinaciones carbonílicas:



b) La hidrogenación de los enlaces etilénicos, limitada hasta aho-
ra solamente a determinados tipos de sustancias no saturadas. La re-
acción inversa, formación de un etileno a partir de un etano, sola-
mente ha podido ser observada con seguridad en el par ácido succínico-
ácido fumárico:



c) La oxidación de aldehidos a ácidos, que tiene especial impor-
tancia en el grupo de los glúcidos:



d) La oxidación de grupos metilo de sustancias alifáticas, alicí-
clicas y aromáticas a grupos carbóxilos en el organismo animal:



Para todos estos tipos de oxidaciones y reducciones se conocen
también otros procedimientos no bioquímicos, pero en muchos casos
se prefiere el empleo de microorganismos o de preparados de fermentos
a causa de la especificidad de sus acciones.

En íntima relación con las reacciones de fermentación están tam-
bién las de formación de grasas a partir de glúcidos. La primera

prueba de que a partir de éstos se forman, efectivamente, en el organismo grasas, la dieron Lawes y Gilbert en ensayos sobre la formación de las grasas de cerdo.

Durante la pasada guerra mundial se obtuvo grasa en gran escala técnica por medio del moho *Endomices vernalis* (P. Lindner). Este material lipídico sirvió durante la guerra para la obtención de una pasta nutritiva, que se expendía en el comercio con los nombres de Evernal y Myceta y se empleaba en usos culinarios. La pasta se mantiene fresca al aire. En los últimos años han emprendido de nuevo ensayos para la obtención de grasas H. Fink y sus colaboradores del Instituto de Industrias de la Fermentación, de Berlín. En sus investigaciones han empleado el *Oidium Lactis*.

Hemos visto esquemáticamente unos cuantos ejemplos que nos revelan la misión trascendental que cumplen las hidrolasas y desmolasas en la industria. ¡Cuántos más podría exponer!... Lograríamos una lista, si no interminable, por lo menos agobiante para un paciente auditorio. Pero no es mi intención enturbiar vuestro claro júbilo por la recepción del nuevo académico con una disertación fatigosa.

Doctor Bustinza: En nombre de la Real Academia de Farmacia, os doy la más cordial bienvenida y os deseo que, a nuestro lado, tengáis largos años de labor fecunda.

He dicho.

TALLERES GRÁFICOS
MARSIEGA
M. Pelayo, 26.-MADRID