

REAL ACADEMIA DE FARMACIA

DISCURSO

LEIDO POR EL

EXCMO. SR. D. ANTONIO IPIENS LACASA

EN LA SESION PUBLICA CELEBRADA EL 26 DE FEBRERO DE 1948 PARA
TOMAR POSESION DE UNA PLAZA DE ACADEMICO DE NUMERO

Y

CONTESTACION

DEL

EXCMO. SR. D. MANUEL LORA TAMAYO



MADRID
MCMXLVIII

DISCURSO
DEL
EXCMO. SR. D. ANTONIO IPIENS LACASA

OXIDACION
Y
REDUCCION BIOLÓGICAS

za elevada y transparencia completa, transparentes y sólidas serán siempre nuestras relaciones.

Me incorporo a la Real Academia de Farmacia sin nota desagradable que acompañe a mi advenimiento, porque, como a nadie reemplazo, a nadie tenéis que llorar. Y esto que para todos es tan lisonjero, lo es más para el que os habla, pues le excusa de redactar notas necrológicas y le permite entrar directamente en la exposición de su trabajo.

Siempre sentí especial predilección por los problemas de la Bioquímica y de la Físico-Química, y ha sido para mí tema apasionante el de la físico-química de los fenómenos vitales, en los que tantos misterios se ocultan. Con estos antecedentes no extrañaréis que ofrezca a vuestra consideración un trabajo doctrinal acerca de «La Oxidación y Reducción biológicas», en el que recopile la situación del problema tal como lo veo en el momento actual.

Un sinnúmero de investigadores le han dedicado largos años de trabajos experimentales; la literatura es copiosa; los resultados, inciertos y, muchas veces, contradictorios. Bien puede afirmarse que de él se ignora más que se sabe. Nuestra labor se ha dirigido a reunir los datos dispersos en distintas monografías y notas bibliográficas, y a formar con ellos un cuerpo de doctrina que permita al lector darse idea del mecanismo oxidativo por el cual se desmoronan los materiales orgánicos en el seno de las células.

Hubiéramos preferido prescindir de la reseña de los fermentos de oxidación y reducción, porque habríase abreviado nuestro trabajo; pero con ello nada ganaría éste, ya que en las monografías de cada uno de los fermentos caben datos y notas de interés que no pueden tener acogida en el texto general y que, de faltar, lo harían inasequible a cierto número de lectores. Perdonad que ni aun en este lugar prescinda de mi vocación docente. Así también, y con el fin de dar autoridad a su contenido y fijar responsabilidades, dispensadme que haya prodigado en exceso las notas bibliográficas.

Quede finalmente señalada la más profunda gratitud hacia mi ilustre compañero el Profesor A. Santos Ruiz, que con generosidad sin límites puso a nuestra disposición la magnífica biblioteca de su Cátedra de Bioquímica, en la que con toda comodidad pudimos consultar libros, monografías y revistas.

PRIMERA PARTE

OXIDACION Y REDUCCION BIOLOGICAS

La demolición de los alimentos y materiales de reserva del organismo y, en general, la destrucción de las sustancias que componen la materia viva, acontece ordinariamente por oxidación; cuando ésta se efectúa con el oxígeno del aire, se llama oxidación *aerobia*, y si se lleva a cabo en ausencia de él, se denomina oxidación *anaerobia*. Abarca la primera los procesos de respiración celular, y comprende la segunda los fenómenos que se conocen con los nombres genéricos de *fermentaciones* y *glucolisis* del músculo. Ambas son la integral de un gran número de óxido-reducciones parciales, realizada cada una con su peculiar procedimiento, pero obedeciendo todas a las mismas normas generales. Un mecanismo fundamental y común rige, en efecto, ambos procesos, entre los que hay menos diferencias que hace cincuenta años se creía. Y es precisamente el estudio de este mecanismo de oxidación lo que va a constituir el objeto del presente trabajo. La diferencia fundamental entre uno y otro proceso la determina el aceptor definitivo de hidrógeno, que en la respiración celular es el oxígeno y en la anaerobiosis un metabolito.

La acción de los fermentos hidrolíticos tiene lugar en todas partes del organismo: en el aparato digestivo, sangre, células, etc.; pues tan hidrólisis es la desaminación de un nucleótido o nucleósido en la trama celular, como la acción lipásica y proteolítica que el jugo pancreático ejerce en el intestino delgado sobre grasas y proteínas, respectivamente. En cambio, los fenómenos de óxido-reducción se llevan a cabo en el seno de las células o, mejor, en la superficie de su trama, casi siempre en íntima conexión con las sustancias químicas que la componen. En algunos casos, los fermentos de oxidación y reducción

están unidos a las estructuras celulares lábil o fuertemente, y sólo mientras persiste este enlace ejercen su acción oxidante.

A la oxidación de los materiales de reserva y de los componentes celulares preceden, casi siempre, degradaciones o despolimerizaciones de las grandes moléculas; unas veces a consecuencia de fenómenos hidrolíticos, como sucede en la oxidación de grasas y proteínas; y otras por efecto de un proceso de *fosforolisis*, en virtud del cual los polisacáridos se convierten en ésteres fosfóricos de las hexosas. Sólo entonces sobreviene la ruptura de las cadenas carbonadas por la acción de los fermentos *desmolíticos*, y sólo entonces, también, se inicia la oxidación de la molécula química.

NATURALEZA CATALITICA DE LA OXIDACION BIOLOGICA

La oxidación biológica tiene lugar a través de una serie de reacciones catalíticas de las llamadas de superficie o contacto. Prueba de ello que un buen número de sustancias capilarmente activas, entre ellas los narcóticos, la inhiben, porque desplazan de la trama celular las moléculas de oxígeno o de metabolitos adsorbidas en su superficie. En unos casos la oxidación biológica debe considerarse como un fenómeno de catálisis microheterogénea, y en otros, los menos, como procesos de catálisis macroheterogénea; a los últimos pertenecen las oxidaciones provocadas por aquellas enzimas que sólo actúan en íntima unión con la estructura de las células.

El catalizador toma parte en la reacción modificando su velocidad y su mecanismo, y dando lugar a reacciones intermedias, en las que momentáneamente se producen combinaciones lábiles entre él y el substrato. De esta forma, el substrato se activa; porque, a consecuencia de la alteración que se produce en las distancias interatómicas o en su estructura electrónica, relájense las fuerzas de enlace y aumenta la actividad de reacción de los átomos correspondientes. Lo que se traduce diciendo que el catalizador disminuye la energía de activación del substrato y acelera la velocidad del proceso. Hace falta, por tanto, que las moléculas del catalizador muestren alguna afinidad para determinados grupos del substrato, pues, en otro caso, las reacciones intermedias no tienen lugar y la catálisis no se produce.

Estas hipótesis concuerdan con la teoría de las reacciones intermedias que sugirió Mittasch para explicar las acciones catalíticas, y han quedado demostradas con el empleo de los modelos de fermentos de Langenbeck. Del estudio de dichos modelos se deduce que los fermentos contienen uno o más grupos activos capaces de reaccionar con el

substrato, y un buen número de grupos activantes multiplicadores de la reactividad de aquéllos. Por eso, algunas sustancias inhiben totalmente el fermento, ya que afectan a los grupos activos; y otras se limitan a retardar la velocidad de reacción, porque sólo actúan sobre los grupos activantes.

La mayoría de los fermentos son proteínas conjugadas cuya especificidad de acción la determina el grupo prostético; a él deben la naturaleza de la acción enzimática (hidrólisis, deshidrogenación, descarboxilación, etc.). En cambio, la especificidad de substrato radica en la apoenzima o soporte coloidal, no porque sea adsorbida por aquél, como en un principio se creyó, sino a causa de la particular disposición *espacial* en que se colocan los grupos activos y activantes del fermento con respecto a los grupos de igual clase del substrato. La proteína activante y el substrato se unen entre sí por determinados puntos; sólo en esta hipótesis puede interpretarse la acción inhibitoria que ejercen sobre el fermento sustancias de estructura análoga al substrato; por ejemplo, el malonato sobre la deshidrogenación del succinato por la succino-deshidrogenasa, inhibición debida a la competencia que se establece entre ambas sales por ocupar la superficie del fermento. Así se explica, también, que una dehidrasa formada por coenzima II y una proteína específica oxide la hexosa-6-fosfato a ácido hexónico-6-fosfórico, y no continúe su oxidación; ésta proseguirá con la misma coenzima II y otra apodehidrasa, también específica, pero incapaz de oxidar la hexosa-6-fosfato.

A veces, con la unión de la proteína activante al grupo prostético se modifica el potencial redox del sistema y con ello la capacidad oxidante del fermento; o se provoca un desplazamiento en las bandas de absorción del espectro, y en consecuencia, un cambio en la energía de activación. Ambas cosas acontecen en la unión de la riboflavina con la proteína específica del fermento amarillo. El potencial redox de éste es más elevado que el de la riboflavina, y mayor su capacidad de oxidación. En la unión de la riboflavina con la proteína, las bandas de absorción de aquélla se desplazan 200 Å hacia el rojo, lo que significa que la energía de activación del fermento amarillo es más baja que la de la riboflavina, y su capacidad deshidrogenante mayor que la de su grupo prostético aislado. Estos y otros hechos se traducen diciendo que la acción enzimática la ejerce el holofermento completo y no la apoenzima ni el cofermento separados.

Hay enzimas que se caracterizan porque en ellas el grupo prostético está fuertemente unido a la proteína; así sucede con los fermentos hemínicos, particularmente con las catalasas. Otras, en que la

unión es ligera; por ejemplo, en las deshidrogenasas que utilizan coenzima; en este caso, el grupo prostético se separa de la proteína mediante diálisis de sus disoluciones acuosas, lo que explica que los dializados no produzcan las acciones enzimáticas que ejercen los extractos completos. Posición intermedia entre una y otra clase de enzimas ocupan los fermentos flavínicos y las carboxilasas, en los que el enlace entre apofermento y cofermento es más fuerte que en las deshidrogenasas con coenzima y menos que en los fermentos hemínicos.

Finalmente, la naturaleza catalítica de las reacciones en que intervienen los fermentos de la óxido-reducción se demuestra en la extraordinaria velocidad con que aquéllas tienen lugar. La adjunta tabla indica el número de fenómenos elementales que cada molécula de los fermentos en ella inscritos realizan por minuto; o, lo que es igual, el número de moléculas de substrato que cada molécula de enzima transforma en dicho tiempo. Los números son lo suficientemente expresivos para ahorrar todo comentario.

ENZIMAS	TEMPERATURA	FENOMENOS ELEMENTALES POR MINUTO
Catalasa	0°	$2,5 \times 10^4$
Citocromo-c	38°	$1,4 \times 10^3$
Citocromo-c-reductasa	25°	4×10^2
Diaforasa	38°	$8,5 \times 10^3$
Aminoácido-oxidasa	38°	2×10^3
Polifenoloxidasa	20°	7×10^4
Alcohol-deshidrogenasa	20°	2×10^4
Triosafosfato-deshidrogenasa	20°	2×10^4
Carboxilasa	30°	1×10^3

EL MECANISMO DE LA OXIDACION BIOLOGICA

Desde la época de Berzelius y Liebig, dos teorías han surgido para interpretar la oxidación que sufren los alimentos y materiales de reserva en condiciones en que aquéllos son estables *in vitro*, frente al oxígeno del aire: 1.ª, Que el oxígeno molecular se active en los tejidos por alguna acción enzimática y adquiera así aptitud para oxidar al substrato (Warburg); 2.ª, Que sea el hidrógeno del substrato el que por la acción de los fermentos adquiera capacidad de oxidarse con el oxígeno molecular (Wieland).

Algunos investigadores de la segunda mitad del siglo XIX acepta-

ron la primera hipótesis y, adelantándose a las recientes ideas de Warburg, supusieron que la actividad del oxígeno está en íntima dependencia con el contenido en hierro de la sangre y los tejidos (Liebig, Bunge, Spitzer, etc.). Otros, en cambio, atribuyeron dicha actividad a la cooperación de peróxidos orgánicos; y las teorías de Engler, Bach y Wild les sirvieron de base para interpretar la activación del oxígeno molecular en las células vivas.

En 1881, Schmiedeberg dudaba que tal activación pudiera producirse en los tejidos animales, y de sus razonamientos surgió la hipótesis de la activación del hidrógeno, con arreglo a la cual los componentes celulares actúan sobre las sustancias oxidables y las hacen accesibles a la oxidación. Schmiedeberg hablaba de fuerzas cuya misión es «aflojar los enlaces que retienen los átomos del substrato y dar a éstos una movilidad tal que les permita unirse con los de oxígeno de la sangre». En sentido análogo se expresaba Pfeffer en 1889, cuando trató de explicar la respiración de las plantas. Algunos años más tarde, en 1910, Wieland desarrolló las ideas apuntadas por Schmiedeberg y Pfeffer, sentando su hipótesis acerca de la oxidación biológica sobre la base de la activación del hidrógeno.

a) *La teoría de Wieland.*—Con la teoría de la deshidrogenación, Wieland trata de explicar el mecanismo de la oxidación biológica suponiendo que el hidrógeno del substrato se activa por acciones enzimáticas, y una vez activado se oxida con el oxígeno molecular u otro aceptor de hidrógeno. Su teoría se basa en el siguiente experimento: «Cuando se agita alcohol etílico con platino en polvo, en presencia de aire, aquél pasa a ácido acético; lo mismo sucede si la mezcla de alcohol y polvo de platino se agita fuera del contacto del aire con azul de metileno u otro colorante capaz de hidrogenarse y convertirse en la forma *leuco*.» En ambos casos, dice Wieland, el platino *afloja* los enlaces del hidrógeno del grupo alcohólico y lo *activa*; el oxígeno o el colorante actúan de aceptores de hidrógeno y, en consecuencia, el alcohol se oxida. A juicio de Wieland, fenómenos análogos tienen lugar en el organismo cuando en él concurren las tres condiciones siguientes: 1.ª Que haya una materia oxidable capaz de perder hidrógeno: el substrato. 2.ª Que exista un catalizador o fermento que pueda activar el hidrógeno de aquél aflojando sus enlaces; a este fermento lo llamó Wieland *deshidrogenasa* o *dehidrasa*; y 3.ª, Que un aceptor de hidrógeno fije el que la dehidrasa arranca al substrato. El substrato, la dehidrasa y el aceptor de hidrógeno sustituyen, respectivamente, en las células, al alcohol, al platino y al oxígeno o azul de metileno del experimento citado.

En 1920, Thunberg probó experimentalmente que el ácido succínico

se deshidrogena en el músculo en presencia de azul de metileno, como aceptor, y de un fermento activador que se conoce con el nombre de succiño-deshidrogenasa. Le bastaba a Thunberg calentar el tejido a temperatura de 80° para que la deshidrogenación cesara, lo que le demostró el carácter enzimático de la reacción. En dicho experimento se cumplen las tres condiciones que Wieland había fijado en la teoría de la deshidrogenación.

b) *La teoría de Warburg.*—Habíase observado, por otra parte, que la oxidación tisular cesa en presencia de pequeñas cantidades de ácido cianhídrico, lo que no ocurre cuando se reemplaza el oxígeno por el azul de metileno en su papel de aceptor de hidrógeno. Este hecho, al parecer intrascendente, se relacionó con otro experimento debido a Warburg, según el cual «una suspensión acuosa de carbón de sangre, que contiene hierro, oxida en contacto de aire algunos aminoácidos, y la oxidación cesa tan pronto se añade ácido cianhídrico». Como quiera que este ácido forma complejos con diversos metales pesados, en particular con el hierro, que en cantidades pequeñísimas hay presente en casi todas las células y tejidos, supuso Warburg que el oxígeno molecular se une al hidrógeno del substrato por intermedio de algún mecanismo enzimático sensible al ácido cianhídrico y capaz de activar el oxígeno, facilitando su unión con aquel elemento. De esta observación surgió la hipótesis de la activación del oxígeno; Warburg creyó que la respiración celular consiste en un fenómeno de catálisis de contacto provocado por fermentos metálicos activadores de aquel elemento, y llamó *oxidadas* a los fermentos capaces de activar el oxígeno dándole aptitud para entrar en combinación fácil con el hidrógeno del substrato.

c) *La teoría de Keilin.*—Cuando Warburg (1) y (2), Keilin (3), Kuhn (4) y Zeile (5) demostraron la naturaleza hemínica de la citocromoxidasa, de las peroxidadas y de las catalasas, y Richter (6) y Kubowitz (7) advirtieron que el cobre es el elemento activo de las fenoloxidasas, quedó confirmado que al lado de los fermentos que activan el hidrógeno del substrato hay otras enzimas activadoras del oxígeno molecular de no menor interés en la oxidación biológica. Keilin unificó en 1925 las teorías de Wieland y Warburg, admitiendo que, en la oxidación biológica, las deshidrogenasas activan el substrato a la vez que las oxidadas acrecen la reactividad del oxígeno molecular.

La teoría de Keilin ha sido confirmada plenamente. La experiencia prueba, en efecto, que las oxidaciones se paralizan al agregar inhibidores que actúen específicamente sobre alguno de los sistemas activantes: por ejemplo, al agregar uretanos, que inhiben la acción de las deshidrogenasas, pero no la de las oxidadas; o ácido cianhídrico, que pa-

raliza a éstas, pero no a aquéllas. Entre los años 1912 y 1927, época en que Warburg hizo sus primeras observaciones, cabía creer que la activación del oxígeno molecular por la acción de las oxidasas consistiera en la ruptura de su doble ligazón y en la aparición de un enlace peroxidico. Hoy el concepto resulta anticuado, y la activación se atribuye a un cambio de valencia electrónica del átomo metálico del fermento, a consecuencia del cual la oxidasa cede electrones al oxígeno molecular y lo convierte en oxígeno iónico \bar{O} , primero, y en iones \bar{OH} , después.

De modo análogo, la activación del hidrógeno del substrato por la deshidrogenasa se atribuye actualmente a una relajación de las fuerzas electrostáticas que unen el electrón con el protón, a consecuencia de la cual el átomo de hidrógeno adquiere fuerte reactividad para con los aceptores; ordinariamente, esta relajación se efectúa por peldaños, a medida que el hidrógeno salta a través de los transportadores de hidrógeno, desde la deshidrogenasa hasta la oxidasa. Por eso, la transferencia de hidrógeno desde la materia oxidable a su aceptor último tiene lugar por intermedio de compuestos no saturados, generalmente a través de sustancias coloreadas de naturaleza mesomérica, en las que hay electrones lábilmemente unidos. Cuando el electrón del átomo de hidrógeno se desliga completamente del protón y corre a reemplazar el que la oxidasa cedió al oxígeno molecular, queda aquélla en condiciones de ionizar nuevas moléculas de oxígeno, activándolas. Por cada par de electrones que llegan del substrato a la oxidasa, dos iones H^+ quedan libres y un átomo de oxígeno se activa y convierte en ión \bar{O} .

Ambos procesos de ionización se realizan con el auxilio de una proteína específica *activante* y de cierto número de sistemas de oxidación y reducción que gradual y sucesivamente transfieren electrones desde el substrato oxidable al oxígeno molecular.

La mayoría de los investigadores son de opinión que las deshidrogenasas arrancan un par de átomos de hidrógeno del substrato en cada fenómeno elemental que realizan. En cambio, Michaelis (8) sustenta la hipótesis de que la deshidrogenación de un substrato oxidable tiene lugar átomo por átomo, ya que los transportadores flavínicos separan, a veces, de un modo fugaz, un radical libre, coloreado, que al fijar el segundo átomo de hidrógeno, pasa a la forma *leuco*, incolora y estable. De la misma opinión que Michaelis participan Haber y Willstätter (9), cuyos esfuerzos por generalizar la teoría de que en la oxidación hay separación intermedia de radicales libres son de sobra conocidos; sin embargo, sólo en contados casos han podido éstos observarse; por eso, es aún creencia generalizada que la deshidrogenación del substrato

tiené lugar por pares de átomos y no por átomos aislados, lo que no impide que ciertos transportadores, entre ellos los de núcleo pirídico, conduzcan un solo átomo de hidrógeno por molécula de aquél.

Los iones $\overset{+}{\text{H}}$ y $\overline{\text{OH}}$, una vez liberados, se unen entre sí conforme a la reacción $\overset{+}{\text{H}} + \overline{\text{OH}} = \text{H}_2\text{O} + 13,7 \text{ Kcal.}$, mucho más suave que la reacción que producen los elementos libres, en la que se desprenden 68 Kcal./mol. La diferencia entre los calores de una y otra reacción no es energía que se pierda; al contrario, por desprenderse poco a poco, durante los procesos elementales de activación y de transporte, se aprovecha mejor en la producción de trabajo muscular o se almacena al estado de ésteres fosfóricos de alta energía, y con ellos se atiende después a otras necesidades.

Wieland creyó, en un principio, que el oxígeno molecular actúa directamente como aceptor de hidrógeno y supuso que, a consecuencia de la reacción, debía formarse agua oxigenada. La presencia de peróxido de hidrógeno ha sido, en efecto, caracterizada, a pesar de que las catalasas lo descomponen rápidamente. Sin embargo, nadie sostiene hoy que el oxígeno molecular sea el aceptor directo del hidrógeno arrancado al substrato; salvo una pequeña fracción, sin interés fisiológico, que obra a través de transportadores flavínicos, el oxígeno que interviene en la respiración celular se ioniza previamente con la intervención de las oxidasas, y en estado de iones $\overline{\text{O}}$ u $\overline{\text{OH}}$ se une a los iones $\overset{+}{\text{H}}$ que provienen del substrato.

En los medios anaerobios el aceptor último de hidrógeno lo constituye un metabolito: el aldehído, en la fermentación alcohólica, y el ácido pirúvico en la glucólisis y fermentación láctica. En estos procesos no intervienen oxidasas que activen el oxígeno molecular, porque no hacen falta o no están presentes; la oxidación la llevan a cabo deshidrogenasas que arrancan hidrógeno del substrato y transportadores que lo conducen al metabolito.

A veces, ambas oxidaciones, anaerobia y aerobia, se ligán en un proceso alternante. Así ocurre en la demolición del glucógeno; los primeros peldaños constituyen un proceso anaerobio que termina en la formación de ácido pirúvico o de ácido láctico; y los últimos representan un fenómeno de respiración celular, en el que parte del ácido pirúvico se quema con oxígeno y otra se resintetiza a glucógeno.

En la deshidrogenación del substrato y combustión de su hidrógeno radica el secreto de la oxidación biológica. Con el hidrógeno se quema simultáneamente el carbono, pero su combustión es consecuencia de reacciones secundarias que acompañan a la deshidrogenación.

En efecto, por cada par de átomos de hidrógeno que pierde el substrato aparece un enlace eténico $-\text{CH}=\text{CH}-$, que una *hidratasa* convierte en $-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$. Deshidrogenaciones posteriores de tipo enzimático provocan la formación de enlaces enólicos $-\text{C}(\text{OH})=\text{CH}-$, primero, y cetónicos $-\text{CO}-\text{CH}_2-$, después. Seguidamente, una *hidrolasa* rompe la cadena y separa dos moléculas, de las que una contiene el grupo carboxilo. De la molécula de ácido, así formada, sobre todo cuanto se trata de ácidos α -cetónicos o bien α -aminoácidos, las *carboxilasas* separan una mol. de CO_2 , si no se desprende espontáneamente, como ocurre en algunos casos. De esta manera, a medida que la deshidrogenación avanza, las moléculas carbonadas se rompen en otras de cadenas más cortas, y en cada fractura hay desprendimiento de una molécula de agua y otra de bióxido de carbono.

EL POTENCIAL REDOX

En las reacciones de oxidación y reducción que gozan de carácter reversible, establécese un equilibrio entre la forma oxidada y la reducida que depende de las condiciones del medio; así sucede con las mezclas de sales ferrosas y férricas o de sales estannosas y estánicas, y con los sistemas de óxido-reducción que intervienen en la oxidación biológica. Se acostumbra a llamarles *sistemas reversibles de oxidación y reducción* o, abreviadamente, *sistemas redox*. Un sistema redox es la mezcla de dos sustancias que, mediante transferencia recíproca de electrones se transforman una en otra. El poder de oxidación o reducción de tales sistemas encuentra su expresión numérica en el llamado *potencial redox*. Su conocimiento interesa extraordinariamente en Biología.

El potencial redox se determina introduciendo un electrodo de platino en la disolución que contiene la mezcla de las sustancias oxidada y reducida, y midiendo el potencial de dicho electrodo contra el electrodo normal de hidrógeno. Designando por *Ox* la forma oxidada, y por *Red* la reducida, la expresión que mide dicho potencial redox es:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad (\text{a})$$

en que E_0 representa el *potencial normal*. Para cada sustancia este valor es constante, y su magnitud se deduce midiendo la fuerza electromotriz de una pila en que $[\text{Ox}] = [\text{Red}]$, es decir, en que la concentración de la sustancia oxidada sea igual a la de la reducida.

El potencial redox de un sistema depende de la presión de hidrógeno gaseoso y del pH. Su expresión algébrica es:

$$E = E'_{0} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\sqrt{P_{H_2}}}{[H^+]} \quad (b)$$

Cuando la presión de hidrógeno P_H importa una atmósfera

$$E = E'_{0} + \frac{RT}{nF} \ln [H^+]$$

Es la ecuación de Nernst aplicada al electrodo de hidrógeno.

El valor de E'_{0} se deduce de la ecuación (b) sin más que dar a P_H el valor de una atmósfera y hacer $[H^+] = 1$; ambas condiciones se cumplen en el *electrodo normal de hidrógeno*. En él se verifica $E = E'_{0}$. Por tanto, E'_{0} representa el potencial normal del electrodo de hidrógeno, al que se ha convenido en darle el valor *cero*. A 30° el potencial redox de un sistema apenas varía, por cada unidad que se eleva el pH. Como en las células vivas el pH oscila muy poco entre 6 y 8, la mayoría de las veces no precisa tenerlo en cuenta para las correcciones del potencial redox. El punto de neutralidad de un sistema redox corresponde a aquél en que el sistema pasa de reductor a oxidante o viceversa. En dicho punto la concentración de la forma oxidada no suele coincidir con la de la forma reducida; es más, en los diversos sistemas redox, la relación de concentraciones de ambas formas alcanza los valores más diversos. Por ejemplo, una mezcla de iones estannosos y estánnicos, en concentraciones iguales, es fuertemente reductora; y una disolución de permanganato potásico en medio ácido, cuya mitad de sal se ha transformado en bióxido, es oxidante.

De estos hechos resulta que el potencial redox de un sistema mide su capacidad oxidante o reductora. Un sistema A, cuyo potencial de oxidación y reducción supera al de otro B, oxida a éste; en cambio, el B reduce al A. Cuanto más fuertemente reducido se halla un compuesto, tanto mayor presión de hidrógeno posee y tanto más negativo será su potencial redox.

Ahora bien, se explica que no baste conocer el potencial redox para predecir si un sistema oxida o reduce a otro. Para que la óxido-reducción tenga lugar, hace falta, además, que la velocidad de reacción sea suficientemente grande. En otro caso, hay necesidad de emplear catalizadores que aceleren la velocidad de la óxido-reducción. Las *redoxasas* o fermentos de oxidación y reducción son sistemas re-

dox reversibles, que actúan como catalizadores en virtud de reacciones intermedias. Estos sistemas lo mismo pueden ser oxidados por un aceptor de hidrógeno que reducidos por un donador; la reacción dependerá del valor de su potencial redox. El compuesto reducido del sistema que se cataliza reacciona con la forma oxidada del catalizador y la reduce, mientras que él se oxida; y el compuesto reducido del catalizador reacciona con la forma oxidada del sistema que se cataliza, y mientras ésta se reduce, aquél se oxida. Las *deshidrogenasas* son redoxasas en que la forma oxidada del catalizador reacciona con la reducida del substrato; y las *oxidadasas* pertenecen a las redoxasas cuya forma reducida reacciona con el oxígeno molecular. Por esto, para que una deshidrogenasa sea eficaz, hace falta que se comporte como oxidante frente al substrato y como reductora frente al aceptor de hidrógeno; lo que se expresa diciendo que su potencial redox ha de estar comprendido entre el del substrato y el del aceptor.

La escuela americana clasifica los sistemas redox, de interés biológico, en tres grupos: *sistemas electroactivos*, *sistemas perezosos* y *sistemas enzimáticos perezosos*.

Incluye entre los *sistemas electroactivos* los que tienen capacidad para cambiar electrones directamente con un electrodo de metal noble. Por regla general, estos sistemas son autooxidables. Transportan electrones del substrato activado o de cualquiera de los otros dos sistemas de oxidación y reducción citados al oxígeno molecular, y, a veces, de un sistema perezoso a otro también perezoso. Los potenciales redox de estos sistemas se determinan midiendo con el potenciómetro la f. e. de una pila formada por dos semicélulas, la *tipo* y la del sistema a estudiar (10). Entre ellos se cuentan las oxidadasas (citocromoxidasa, polifenoloxidadasas, etc.) y los fermentos flavínicos.

A los *sistemas perezosos* de óxido-reducción pertenecen sistemas redox que no se oxidan por el oxígeno molecular, pero sí por los sistemas electroactivos; tales complejos se reducen por un buen número de sustancias oxidables. Sistemas perezosos son los citocromos y las codehidrasas I y II. Sus potenciales redox no se pueden determinar más que con ayuda de sistemas electroactivos, bien sea potenciométrica- mente, o bien calorimétrica- o espectrofotométricamente, conforme al método aplicable al sistema electroactivo agregado. En este caso el potencial E'_{0} del sistema perezoso se deduce del valor del potencial E''_{0} del sistema electroactivo en equilibrio con él; la ecuación aplicable tiene la forma

$$E'_{0} = E''_{0} - \frac{RT}{nF} \ln K$$

en la que K representa la constante de equilibrio del sistema formado por la mezcla del electroactivo y del perezoso.

Finalmente, los *sistemas enzimáticos perezosos* no toman el potencial más que en presencia de un sistema electroactivo y de una enzima; ésta por cuanto obra de catalizador; sin uno y otra asociados a él la transferencia de electrones no es apreciable. El potencial de tales sistemas se puede medir electrométrica- o colorimétricamente, y a ellos es aplicable la fórmula del caso anterior. En este grupo se incluyen el sistema oxalacetato \rightleftharpoons malato del ciclo Szent Györgyi, el cis-aconitato \rightleftharpoons isocitrato del ciclo de Krebs, el alcohol \rightleftharpoons aldehído, etcétera, todos ellos con sus enzimas correspondientes.

El cuadro adjunto indica los potenciales redox de algunos sistemas de óxido-reducción con interés bioquímico medidos a $\text{pH} = 7$. Al describir cada una de las enzimas oxidantes y estudiar las reacciones que catalizan, se indicarán los autores que determinaron dichos potenciales.

SISTEMAS REDOX DE INTERES BIOLÓGICO

SISTEMAS	POTENCIAL NORMAL VOLT.
Electrodo de oxígeno	0,810
o-quinona—pirocatequina	0,430
Citocromo-c oxidado y reducido	0,262
Hemoglobina—metahemoglobina	0,152
Acido dehidroascórbico—ácido ascórbico	0,080
Azul de metileno—leucobase	0,011
Acido fumárico—ácido succínico	0,000
Fermento amarillo—hidruro	-0,060
Acido oxalacético—ácido málico	-0,169
Acido pirúvico—ácido láctico	-0,180
Lactoflavina-fosfato—hidruro	-0,185
Acetaldehído—alcohol etílico	-0,190
Hemo—hematina	-0,200
α -glicerofosfato—aldehído-3-fosfoglicérico	-0,250
Codehidrasa I—hidruro	-0,270
Ac. β -hidroxibutírico—ac. acetilacético	-0,282
Acido úrico—xantina	-0,361
Xantina—hipoxantina	-0,371
Hidrogenasa e hidruro	-0,407

Dicho cuadro muestra que los sistemas redox con potencial más positivo son la o-quinona—pirocatequina y los citocromos; y el sistema de potencial más negativo, la *hidrogenasa* del *B. coli*, que cataliza de modo reversible la reacción $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}$. El potencial re-

dox de la citocromoxidasa debe estar comprendido entre el del oxígeno molecular y el del citocromo, con un valor que probablemente se aproxima más al de éste que al de aquél.

A pH constante, el potencial redox de los fermentos de oxidación y reducción varía fuertemente con la naturaleza de la proteína. Lo que significa que los potenciales redox de los compuestos de codehidrasa I ó II con las diversas proteínas activantes son distintos, como lo son también los de los compuestos que forman los flavin-mononucleótidos y flavin-dinucleótidos con las diversas apodehidrasas. Compárese, por ejemplo, en el cuadro anterior, el valor del potencial redox de la lactoflavina-fosfato con el del viejo fermento amarillo. Se comprende, por tanto, que un mismo grupo prostético origine diversas redoxasas, con potenciales de oxidación y reducción diferentes, según sea la proteína a que se enlace; y que las diversas redoxasas muestren fuerte especificidad de substrato, aun cuando todas ellas posean el mismo grupo prostético.

Entre el substrato oxidable y el oxígeno, o entre el substrato y el metabolito que actúa de aceptor último, hay siempre intercalada una serie de sistemas redox en equilibrio que regula el transporte de hidrógeno. La velocidad de reacción de la cadena depende de la naturaleza de cada uno de los sistemas redox interpuestos y de su acción recíproca. Pero el orden de sucesión de los transportadores no es arbitrario, sino que lo determina su potencial redox. El viejo fermento amarillo puede catalizar la reducción del ácido fumárico a succínico, pero no la de acetaldehído a alcohol; en cambio, la flavina libre cataliza también la hidrogenación del aldehído. A causa del elevado potencial del citocromo-c, este pigmento sólo puede reducir al oxígeno molecular, y esto a través de la citocromoxidasa; en cambio, oxida a un sinnúmero de sistemas.

SEGUNDA PARTE

LOS FERMENTOS DE OXIDACION Y REDUCCION

El cuadro adjunto contiene los principales tipos de fermentos que intervienen en los fenómenos de oxidación y reducción de la materia viva. Para su agrupación se ha seguido un criterio químico, procurando armonizar la clasificación que adopta el Profesor A. Santos Ruiz en su obra «Fermentos», edición Saeta, 1944, Madrid, con la que utiliza el Profesor M. Lora Tamayo en su opúsculo «Modernas orientaciones en Química de Enzimas», edición Saeta, Madrid, 1942, y la que siguen Sumner, J. B. y Somers, G. F. en su libro «Chemistry and Methods of Enzymes», Nueva York, 1945.

Con el fin de que el lector pueda adquirir idea clara de los procesos de oxidación y reducción que se exponen en la tercera parte del trabajo, sin que para ello necesite consultar los tratados de Enzimología, hemos creído conveniente reseñar en las páginas que siguen las principales características de los fermentos de oxidación y reducción. En las breves monografías que de ellos se hacen, no se indican los métodos de preparación ni los procedimientos experimentales más en uso para medir su actividad. El lector los encontrará descritos con detalle en los tratados clásicos de Fermentos.

Otras enzimas intervienen en los procesos de oxidación y reducción biológica, pero ello en calidad de auxiliares. Son las descarboxilasas y la zimohehexasa, las fosforilasas, las ferasas (transfosforilasas y transaminasas), las isomerasas y las hidratasas. Remitimos al lector a los libros de Enzimología, donde encontrará información detallada de todas ellas.

FERMENTOS DE OXIDACION Y REDUCCION

Oxidasas	}	Directas	}	Con hierro. Con cobre. Inclasificables.
		Indirectas	}	Peroxidasas. Catalasas.
Deshidrogenasas	}		}	Sin grupo prostético. Grupo prostético aloxacínico. Grupo prostético pirídico. Grupo prostético thiazólico. Inclasificables.
Mutasas	}		}	Aldehidomutasas. Glioxalasa.
Transportadores	}	Enzimáticos	}	Aloxacínicos. Pirídicos. Thiazólicos. Hemínicos.
		No enzimáticos:	}	

I — O X I D A S A S

Las oxidasas activan el oxígeno, transfiriéndole electrones y convirtiéndolo en iones \bar{O} u \bar{OH} . Los electrones proceden del hidrógeno del substrato, y llegan a ellas a través de las deshidrogenasas y de los transportadores. Las oxidasas son fermentos de la vida aerobia. Pertenecen al grupo de metal-proteínas, y suelen ser proteidos en que el metal, cobre o hierro, forma parte integrante del grupo prostético. En las oxidasas del reino animal el elemento activo es el hierro, y en las del reino vegetal el papel de activador lo desempeña el cobre, en la mayoría de los casos.

Unas, activan directamente el oxígeno molecular: se llaman *oxidasas directas*; otras, tienen por substrato el agua oxigenada: reciben el

nombre de *oxidasas indirectas*. A las primeras pertenecen la citocromoxidasa y la tirosinasa, entre otras; y a las últimas, las peroxidasas. Forzando un poco la definición de oxidasas indirectas, incluimos entre ellas las catalasas, que activan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

a) OXIDASAS DIRECTAS CON HIERRO

Citocromoxidasa.

Los tejidos animales dan la reacción de azul de indofenol cuando en ellos se inyectan disoluciones alcalinas de α -naftol y dimetil-p-fenilenodiamina (reactivo NA-DI) (11) y (12). Este reactivo sirvió a Ehrlich para descubrir la *indofenoloxidadasa* o enzima oxidante que provoca la oxidación rápida de aquella mezcla. Keilin (13) comprobó que se trata de una oxidadasa. Hoy se llama *fermento de la respiración de Warburg* o *citocromoxidasa*.

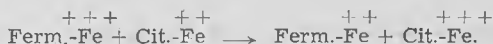
Oxida la mayoría de los metabolitos a través de los citocromos (14), y es el fermento indispensable para la respiración celular, tanto en animales, en que el transporte de oxígeno lo efectúa la hemoglobina, como en aquellos otros (crustáceos y moluscos) que lo lleva a cabo la hemocianina. En menor escala, interviene en la respiración celular de organismos inferiores, vegetales y animales, e incluso en plantas superiores. En la materia viva se halla en proporción que no excede de 0,1 gramo por Kg.; abunda en las células de mayor capacidad respiratoria, por ejemplo en el músculo cardíaco.

Es insoluble y está fuertemente enlazada a la trama celular, por lo que se tropieza con serias dificultades para obtenerla pura. Keilin y Hartree (15) consiguieron preparados de músculo cardíaco de cerdo conteniendo citocromoxidasa en suspensión impura. Stotz y colaboradores (16) la han obtenido exenta de citocromo. Es termo-lábil; se destruye a 58°.

Pertenece a los cromoproteidos con hierro y está formada por la unión de una hemina con una proteína de naturaleza desconocida. Puede existir en dos formas: una reducida, el *ferro-fermento*, en que el metal funciona con valencia II, y otra oxidada, el *ferri-fermento*, en que el hierro posee valencia III. La forma reducida es autooxidable, y en la oxidación pasa a ferri-fermento.



En cambio, a la forma oxidada la reduce el citocromo reducido o citocromo $\overset{++}{\text{Fe}}$.



Con esta reacción la citocromoxidasa recobra los electrones que cedió para la activación del oxígeno. Los que el citocromo cede al fermento de Warburg proceden del hidrógeno que las deshidrogenasas arrancaron al substrato y llegaron a él por intermedio de los transportadores.

De donde resulta, que el mecanismo de oxidación y reducción de la citocromoxidasa es distinto del que utiliza la hemoglobina en el transporte de oxígeno a lo largo del torrente circulatorio. El pigmento sanguíneo fija oxígeno sin que el átomo de hierro hemínico cambie de valencia, pues lo mismo en la hemoglobina como en la oxihemoglobina, el hierro se halla al estado de *hemo* y actúa como bivalen-

te. Por el contrario, en la oxidación de la citocromoxidasa, el hierro sufre un cambio de valencia y pasa de bi- a trivalente, pero no fija oxígeno, a no ser momentáneamente, en cuyo caso formaría un complejo inestable y de vida corta. Por esto, la acción oxidante de la citocromoxidasa no depende de la presión parcial de oxígeno, y es, en cambio, función de ella la acción transportadora de la hemoglobina.

El fermento de la respiración de Warburg constituye un sistema redox reversible, de tipo electroactivo, lo que no ocurre con la hemoglobina. Dicho sistema actúa acoplado con otro también redox, el de los citocromos, de potencial inferior al de la citocromoxidasa.

El ácido cianhídrico y el sulfhídrico inhiben las dos formas de citocromoxidasa, la oxidada y la reducida. En cambio, el CO sólo paraliza la oxidación de la enzima, porque únicamente se combina con el ferro-fermento. La reacción es parcial y reversible, y depende de la presión de oxígeno y de óxido de carbono; además, no se efectúa más que en la oscuridad, pues la luz disocia al compuesto con mayor rapidez que a la carboxihemoglobina. De esta propiedad se ha sacado partido para deducir el espectro de absorción de la citocromoxidasa (18) y (19), comprobándose que es intermedio entre el de la hemoglobina y el del *hemo*; las mayores analogías las muestra con el espectro de la *clorocruorina* del gusano *Spirographys*, o, mejor aún, con el del compuesto de la hematina de este gusano y su globina. Por estas razones créese hoy que el grupo prostético de la citocromoxidasa coincide con el que resulta de sustituir uno de los vinilos de la protoporfirina por el grupo —CHO.

b) OXIDASAS DIRECTAS CON COBRE

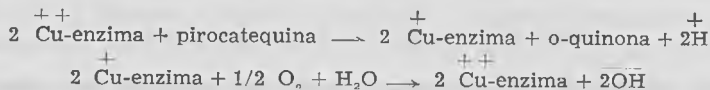
Fenoloxidasas.

Son el alma de los fenómenos de oxidación y reducción en los vegetales. Oxidan los fenoles: pirocatequina, pirogalol, tirosina, etc. Raver (20) distingue entre monofenoloxidasas y polifenoloxidasas. Las primeras oxidan a los monofenoles (tirosinasa) y las últimas a los polifenoles (tirosinasa, dopaoxidasa, lacasa, etc.).

Se hallan en los vegetales, lo mismo en los superiores que en hongos y bacterias; las hay en la sangre y tejidos de diversos animales, pero no tan profusamente repartidas como en el reino vegetal, ni en la misma proporción. Richter (21) y Kubowitz (22) las han obtenido de la patata; y Keillin y Mann (23) de las setas.

Son cobre-proteínas, y el contenido en metal asciende a 0,20-0,25 %. Los cianuros y el SH₂ inhiben todas las fenoloxidasas, y los iones cúbricos las reactivan. Con menor intensidad las inhibe también el CO; pero, a diferencia de la citocromoxidasa, la luz no reactiva el fermento.

La oxidación que provocan las fenoloxidasas se debe a un cambio de valencia del átomo metálico; durante él, el cobre pasa de ión $\overset{++}{\text{Cu}}$ a ión $\overset{+}{\text{Cu}}$, con lo que el oxígeno se ioniza y activa en reacciones como las siguientes:



Tirosinasa.

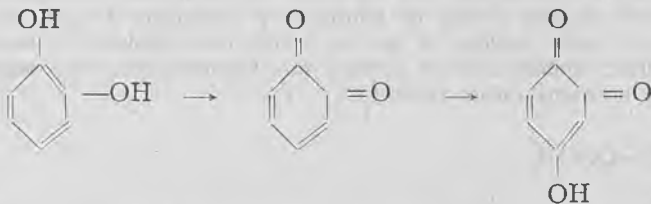
En 1895, Bourquelot y Bertrand la descubrieron en diversos hongos (25) y (26), demostrando que su substrato es la tirosina. A ella se debe el ennegrecimiento que experimentan en contacto del aire algunos tejidos vegetales, en corte reciente (patatas, manzanas, etc.), el que sufren los hongos, y el color de la tinta de los cala-

mares. Abunda en crustáceos y moluscos; entre los vegetales, las mondaduras de patatas, los bulbos de la dalia, el salvado de cereales y las setas, son materias primas ricas en este fermento. Pertenece a las enzimas respiratorias de más interés en los vegetales (27) y (28).

Cataliza la oxidación de los monofenoles a o-difenoles, y oxida también algunos de éstos. Es decir, posee actividad de monofenolasa y de polifenolasa a un tiempo. Oxida el fenol ordinario en pirocatequina, al m- y p-cresol en homocatequinas, y a la tirosina en dihidroxifenilalanina (*dopa*) (29). Pero también oxida al o-difenol y a la *dopa* en las ortoquinonas correspondientes. No oxida la resorcina, la hidroquinona ni el ácido ascórbico. La oxidación, una vez empezada, prosigue hasta formar pigmentos oscuros, y aun negros, análogos a las melaninas.

Kubowitz (30) la preparó de la patata, con un contenido en cobre de 0,2 %; Keilin y Mann (31) de un hongo, el *Psaliota campestris*, con 0,3 % de cobre; y Dalton y Nelson del *Lactarius piperatus*, con 0,25 % de metal. En 1938, estos autores obtuvieron tirosinasa cristalizada (32); los cristales son incoloros, insolubles en agua y ácidos y solubles en disoluciones alcalinas.

Hasta hace poco (31) y (33), creyóse que se trataba de una polifenoloxidasas, puesto que a medida que se purifica disminuye la actividad de monofenoloxidasas y crece la de polifenolasa. Dalton y Nelson comprobaron que una y otra actividad dependen del origen del preparado; la tirosinasa del hongo *Lactarius piperatus* oxida intensamente a los monofenoles y apenas ejerce acción sobre los difenoles; en contraste con la tirosinasa del *Psaliota campestris*, que se comporta, principalmente, como polifenoloxidasas. Hoy se admite que la tirosinasa posee las dos actividades enzimáticas citadas, no porque conste de dos fermentos diferentes, sino porque aquéllas dependen del tamaño, forma y características de la superficie del metal-proteína.



Dichas reacciones muestran que en la oxidación de una mol. de pirocatequina a una de hidroxiquinona se consumen dos átomos de oxígeno y no se produce agua oxigenada. La hidroxiquinona se polimeriza después rápidamente y convierte en un pigmento negro, como el ácido húmico o la melanina. La oxidación de los monofenoles por la tirosinasa se inicia con la formación de o-difenol y prosigue después de la manera ya indicada. Se comprende, por tanto, que en la oxidación de los monofenoles por la tirosinasa se consuman tres átomos de oxígeno por molécula de monofenol y no se separe tampoco agua oxigenada (34).

L a c a s a

El fermento que ennegrece y endurece el jugo del *Rhus succedanea* del Tonkin y del *Rhus vernicifera* del Japón, es una polifenoloxidasas que oxida a los polifenoles en o- y p-quinonas, pero que no actúa sobre la tirosina. Obra sobre los jugos amarillos de aquellas plantas y los convierte en una laca negra. Su substrato es el

urushiol $\begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_3 \\ \left\langle \begin{matrix} \text{OH} \\ \text{OH} \end{matrix} \right. \\ \text{C}_{16}\text{H}_{27} \end{matrix}$ o el hidrourushiol, a los que transforma en las ortoquinonas correspondientes.

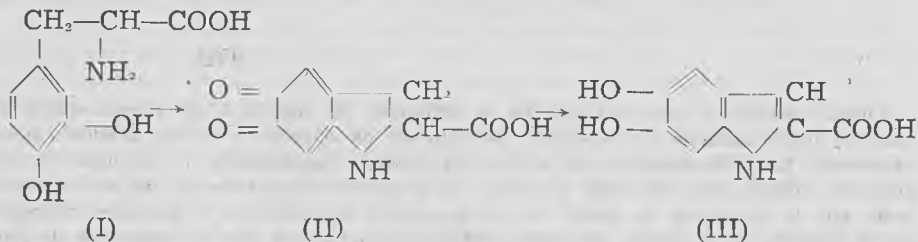
Se encuentra en las patatas, azúcar de remolacha, manzanas y algunos hongos. La descubrió Yoshida en 1883 (35). Se creía que la 'acasa del Tonkín contenía 0,24 % de cobre (36) y estaba exenta de hierro y manganeso; trabajos posteriores de Bertrand (37) demuestran la existencia en ella de manganeso y un contenido en cobre no superior a 0,04 %.

c) OXIDASAS DIRECTAS INCLASIFICABLES

Dopa oxidasa.

Su descubrimiento se debe a Bloch, quien encontró en los melanoblastos de la piel de animales superiores un fermento que oxida la *dopa* o 1-2-4-dihidroxi-fenilalanina, convirtiéndola en un pigmento negro, la melanina. Se obtiene de la piel de conejos recién nacidos. El SH_2 la inhibe fuertemente, y con menor intensidad los cianuros. Es específica de la *dopa*: no oxida a su inverso óptico ni a otros fenoles.

Arnou (39) cree que la luz ultravioleta convierte la tirosina en *dopa*, por lo que, según este autor, la luz solar puede provocar el oscurecimiento de la piel a consecuencia de la reacción de la dopaoxidasa sobre la *dopa*. Raper y Wormal (40) estiman que en la oxidación se produce primero una sustancia roja (la o-quinona marcada con el número II); y, a continuación, mediante un proceso que no es ni oxidativo ni enzimático, un dioxindol incoloro (III). El paso de este compuesto a melanina se efectúa por una oxidación de naturaleza no enzimática, en la que hay pérdida de dos átomos de hidrógeno y aceptación de uno de oxígeno. El proceso es totalmente análogo al que se indicó para explicar el ennegrecimiento de los difenoles; también aquí se produce una hidroxiquinona que seguidamente se polimeriza en melanina (véase tirosinasa).



Nada se sabe de la naturaleza de la dopoxidasa. Se ignora si se trata de algún cuproproteido. Se ha incluido en este grupo porque su substrato es de naturaleza fenólica.

Acido ascorbicoxidasa.

Oxida el ácido ascórbico a dehidroascórbico, con separación de agua oxigenada cuando el oxígeno es el aceptor de hidrógeno (40). Para Huszak, la ácido ascorbicoxidasa es una verdadera deshidrogenasa. En cambio, Keilin y Hartree (41) la creen una oxidasa.

Szent-Györgyi (42) la descubrió en las hojas de calabaza, de donde la obtuvo (43). No se encuentra en los tejidos animales. Abunda en los vegetales, y son sus ma-

terías primas la calabaza, pepinos, plátanos, espinacas, etc. No ha mucho tiempo, varios investigadores la obtuvieron cristalizada (44) y (45). Su acción la catalizan indicios de sales de cobre. Quizás se trate de un cuproproteido cuyo contenido en cobre oscila entre 0,15 y 0,25 %. El ácido cianhídrico la inhibe, pero no el ácido sulfhídrico ni el óxido de carbono. La oxidación reversible del ácido ascórbico la efectúa este fermento con un pH óptimo de 5,5.

Szent-Györgyi (46) atribuye al ácido ascórbico-oxidasa un importante papel en la respiración celular de las plantas; para él, el ácido l-ascórbico es un transportador de hidrógeno entre el substrato y la ascorbicoxidasa.

Hopkins y Morgans (47) demostraron que la ácido ascórbicooxidasa no oxida directamente al glutathión reducido, pero sí a través del ácido dehidroascórbico.

U r i c a s a .

Oxida el ácido úrico en alantoína, y la acción se produce en todos los mamíferos, excepto en el hombre y en los antropoides..



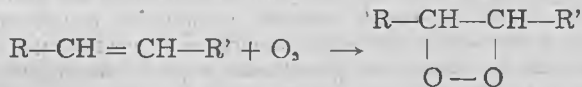
Encuétrase en el hígado y riñón de los mamíferos, de donde se obtiene (48); asimismo, en el hígado de numerosos peces. No la hay en el hombre.

Fué descubierta por Wiechowski (49) y estudiada con detalle por Keilin y colaboradores (50). No se conoce con seguridad su naturaleza química, pero parece pertenecer a los fermentos hemínicos, ya que los preparados que se han obtenido hasta aquí contienen algo de hierro (51). Dawidson (52) comprobó que contenía 0,02 % de hierro y 0,09 % de cinc. La inhiben los cianuros.

L i p o x i d a s a .

En 1929, Haas y Bohn descubrieron en algunas leguminosas una enzima que en presencia de oxígeno destruye el pigmento amarillo de harina de trigo y los carotinoides de la yema de huevo. Esta enzima, a la que se llamó *lipoxidasa*, fué hallada después en tejidos animales. Hauge (53) observó que en la alfalfa hay fermentos que destruyen la vitamina A.

En 1940, Sumner J. B. y Sumner R. J (54) comprobaron que las enzimas de las leguminosas no descolorean los carotenos, a no ser que vayan acompañados de grasas no saturadas. En estas condiciones, la descoloración de los carotinoides la creen debida a la lipoxidasa, que cataliza la reacción.



El peróxido así formado oxida por inducción a los carotinoides, a la provitamina A y a la clorofila. Como substrato de la lipoxidasa suele actuar un ácido graso en cuya cadena haya el grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$

Recientemente se ha discutido la posibilidad de que la lipoxidasa sea una deshidrogenasa (55).

d) OXIDASAS INDIRECTAS

Peroxidasas.

Descomponen el agua oxigenada con separación de oxígeno activo, por cuyo mecanismo oxidan a otros substratos (fenoles, diaminas, etc.) en una verdadera reacción acoplada.

Se encuentran en los tejidos vegetales; sobre todo en semillas y frutos. Escasean en los animales; suelen hallarse en el bazo, pulmón, leucocitos y tejidos linfáticos; abundan en la leche. La mayoría de las peroxidasas que se creyó haber encontrado en los tejidos animales son *pseudoperoxidasas*, es decir, compuestos hemáticos que ejercen pequeña acción peroxidásica (hemoglobina, hematina y citocromos).

Peroxidasas se obtienen de los rábanos y patatas. Thunberg (56) y Elliot (57) las han preparado de la leche.

Contienen 0,64 % de hierro. Son termostables. El ácido cianhídrico y el sulfhídrico las inhiben, pero el óxido de carbono no las afecta. Estos hechos se hallan de acuerdo con su estructura hemínica (58) del tipo de la metahemoglobina, en que el hierro se comporta siempre como trivalente. Las peroxidasas no constituyen sistemas redox, ya que al oxidar un substrato permanece inalterable la valencia de su átomo de hierro.

Son oxidasas indirectas, pues no activan el oxígeno molecular sino el del agua oxigenada, que constituye su substrato específico. Para ello utilizan el peróxido de hidrógeno que se produce en la oxidación, y en una reacción acoplada oxidan a otros substratos: fenoles, aminas aromáticas, etc. Según Szent-Györgyi (59) oxidan el ácido ascórbico a través de sustancias fenólicas, por ejemplo, adrenalina, flavonoles, etc., o sus glucósidos. Algunos autores interpretan las reacciones admitiendo que se forma un compuesto molecular entre el fermento y el H_2O_2 ; este complejo intermedio arranca hidrógeno a un substrato y lo oxida, con lo que el complejo se disocia en el fermento y dos moléculas de agua.

Tienen considerable interés en los procesos de óxido-reducción que se efectúan en el reino vegetal. La dihidroximaleicoidasa que describen Banga y Szent-Györgyi (60) es, a juicio de Swedin y Theorell, una verdadera peroxidasa (61).

Catalasas

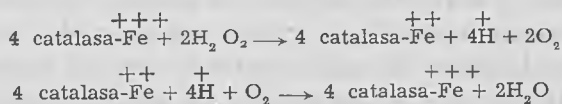
Su substrato único es el agua oxigenada, a la que descomponen en agua y oxígeno molecular. Sólo actúan en medio aerobio. Tienen acción antitóxica, porque destruyen aquel peróxido e indirectamente provocan reacciones de oxidación. Por esto se les incluye entre las oxidasas indirectas. Loeb las descubrió en 1901.

Hállanse muy repartidas en tejidos vegetales y animales, en especial en hígado, riñón, glóbulos rojos y leucocitos; en bacterias aerobias y hongos superiores. En 1937. Sumner y Dounce (62) la obtuvieron cristalizada a partir de hígado de buey; y en 1941 Laskowski y Sumner (63) la prepararon de los eritrocitos del referido rumiante. El color de los cristales depende de la iluminación; sus disoluciones acuosas son amarillas, y rojo oscuro las concentradas. El SH_3 y el CNH las inactivan; no las inhibe el CO en presencia de oxígeno, porque la actividad de éste es mayor que la de aquél.

Zeile y Hellström (64) demostraron que las catalasas son fermentos hemínicos cuyo grupo prostético tiene idéntica naturaleza que la protohematina de la hemo-

globina (65); la diferencia con ésta radica principalmente en la proteína. La catalasa cristalizada que obtuvo Sumner contiene 0,09-0,1 % de hierro, y su peso molecular asciende a 248.000. De estos datos se deduce que cada molécula de catalasa contiene cuatro átomos de hierro y cuatro grupos hemínicos (66).

En las catalasas el hierro funciona como trivalente y no se reduce más que por el agua oxigenada. A juicio de Keilin y Hartree, las reacciones son las siguientes (67):



con los que se cumple la ecuación total $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Sumner y Dounce interpretan la acción catalítica de las catalasas admitiendo la formación intermedia de peróxidos, y Haber y Franck con la separación de radicales libres de elevada reactividad; a ninguna puede atribuirse preferencia, porque ninguna explica satisfactoriamente la acción catalítica.

Haldane (68) ha medido la actividad de algunas catalasas y ha comprobado que cada mol. de catalasa puede descomponer 10^5 mol. de peróxido de hidrógeno por minuto. La propiedad catalásica de la hemoglobina es incomparablemente inferior.

II.—DESHIDROGENASAS

En opinión de Wieland, las deshidrogenasas son fermentos de oxidación y reducción que arrancan hidrógeno al substrato y lo ceden a un *aceptor*. Como *aceptor* primero, actúa el grupo prostético de la deshidrogenasa, si lo hay, y de *aceptores* sucesivos los diversos *transportadores*; el último *aceptor* es un metabolito, cuando se trata de procesos de óxido-reducción anaerobios (fermentación, glucolisis, etc.), o el oxígeno molecular, en el caso de la respiración celular.

En la reacción del substrato con la deshidrogenasa, aquél se activa a consecuencia de un cambio en su estructura electrónica, cambio que facilita la transferencia de electrones entre substrato y *aceptor* a través de los sistemas de oxidación y reducción intercalados. Este original concepto de deshidrogenasa se debe a Guzmán Barrón (69), y se basa en experimentos de Dixon y Zerfas, que prueban cómo algunas proteínas activantes, purísimas, y exentas de codehidrasa, oxidan a sus respectivos substratos en presencia de aloxana.

Hay deshidrogenasas que no contienen grupo prostético; se las considera como proteínas sencillas. Pero la mayoría pertenecen al grupo de los proteidos y poseen un núcleo prostético de naturaleza pirídica, flavínica o thiamínica. El cuadro de la página 24 resume la clasificación de deshidrogenasas que aceptamos para el estudio de estos fermentos.

Los autores no están todavía de acuerdo respecto al concepto de deshidrogenasas. Mientras unos consideran como tales al fermento completo, es decir, al proteido, cuando tiene este carácter, los más atribuyen aquella significación a su *proteína específica o activante*, esto es, a lo que en la nomenclatura de Euler se llama *apodehidrasa* o *apodehidrogenasa*. Para estos autores, el grupo prostético, si lo hay, constituye el primer aceptor y el primer transportador de la serie. En los casos en que la unión de ambos componentes del fermento es fuerte, como sucede con las deshidrogenasas de grupo prostético flavínico, cuadra mejor el nombre de deshidrogenasa para el fermento completo; en cambio, en aquellos otros de enlace débil, por ejemplo en las deshidrogenasas de grupo piridin-adenin-dinucleótido, parece más indicado considerar como deshidrogenasa a la proteína activante, o sea a la verdadera apodehidrasa, aunque la acción deshidrogenante no la ejerza más que el fermento completo. En el presente trabajo atribuímos al grupo prostético o cofermento el papel de aceptor y transportador, y asignamos a la proteína activante el de deshidrogenasa. De aquí que se reserve para el capítulo de «Transportadores» la reseña de los grupos prostéticos correspondientes.

Las dehidrasas son termolábiles. Las inhiben los uretanos por cuanto se condensan en su superficie; pero no el óxido de carbono ni el ácido cianhídrico, lo que las distingue de las oxidasas. Son muy específicas; sólo actúan sobre substratos determinados o grupos de substratos afines. A las deshidrogenasas altamente específicas, de substrato único, pertenece la hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa, que sólo es capaz de activar y oxidar la hexosa-6-fosfato; y entre aquéllas de poca especificidad se incluyen las que oxidan los aminoácidos. Sin embargo, puede afirmarse que entre los diversos componentes de una cadena de oxidación y reducción, la deshidrogenasa es el único que posee especificidad enzimática de substrato. El parentesco entre deshidrogenasa y substrato es más íntimo que entre aquélla y coenzima; porque mientras una coenzima puede colaborar con varias deshidrogenasas, cada deshidrogenasa sólo suele activar un substrato.

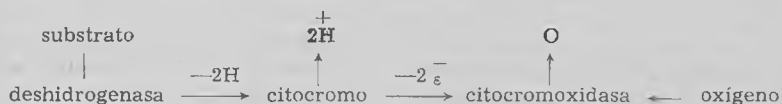
Las deshidrogenasas gozan de fuerte actividad. Un gramo de hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa purísima, en presencia de codehidrasa II, del substrato y de flaviproteínas, consume 350 cm.³ de oxígeno por minuto (70); y un gramo de codehidrogenasa II, en presencia de glucosa-6-fosfato, de la deshidrogenasa y del fermento amarillo, gasta 1.000 c. c. de oxígeno en igual tiempo.

Ninguna información cierta se posee sobre la estructura de las apodehidrasas; a lo más, se conocen los aminoácidos de que se componen y alguno de sus grupos activos, pero en pocos casos se puede asegurar

a qué grupo deben su especificidad para el substrato y su afinidad para el grupo prostético. Muchas de ellas contienen radicales—SH, en los que, al parecer, radica su actividad. Hopkins y Morgan (71) los comprobaron en la succinodeshidrogenasa; Rapkine (72) en la aldehido-fosfoglicérico-deshidrogenasa; y Euler y Adler (73) en la hexosa-fosfato-deshidrogenasa. Barrón y Sunyer' (74) los han caracterizado en la alcohol-deshidrogenasa de levadura, en las pirúvico- y glutámico-deshidrogenasa, en la monoamino- y d-aminoácidoxidasa y en la málico-deshidrogenasa, demostrando que faltan en la isocítrico-deshidrogenasa, alcohol-deshidrogenasa del hígado, lácticodeshidrogenasa y diaminoxidasa (75). Dichos grupos no suelen encontrarse en las oxidasas. Tan larga relación de proteínas activadas por radicales —SH demuestra el importante papel que algunos aminoácidos (cisteína, glutathión, etc.) están llamados a desempeñar en la fermentación y respiración celular. No hay pruebas ciertas de que los grupos —SH se comporten como sistemas de oxidación y reducción, pero tampoco se duda de que tales grupos sirvan de enlaces entre enzima y substrato.

a) DESHIDROGENASAS SIN GRUPO PROSTETICO

A ellas pertenecen la succino-deshidrogenasa, la lácticodeshidrogenasa de levaduras y la α -glicerofosfato-deshidrogenasa II. Son insolubles e inseparables de la estructura celular, con excepción de la lácticodeshidrogenasa de las levaduras, que se disuelve en agua. No requieren transportadores de hidrógeno, pues lo conducen directamente al sistema citocrómico para abandonar en él un electrón y dejar libre el ión $\overset{+}{H}$.



Sus hidruros no reaccionan directamente con el oxígeno molecular; Stern y Melnick (76) aseguran haber aislado un fermento, al que llaman *coenzima protídico*, con capacidad para transferir un electrón desde la succino-dehidrasa, al citocromo, y de abandonar simultáneamente un ión $\overset{+}{H}$.

Succinodeshidrogenasa.

Oxida al ácido succínico en ácido fumárico. Hállase esparcida en los tejidos animales, y abunda en el corazón, hígado y riñón (77). Green y Ogston (78) la obtuvieron de estos materiales mezclada con citocromoxidasa. Encuéntrase también en vegetales y microorganismos. La inhiben los uretanos, pirofosfatos, ácidos malónico, fumárico y oxalacético. Su actividad se debe a grupos —SH; por eso la inhiben

también cuerpos que oxiden pares adyacentes de estos grupos para dar lugar a enlaces —S—S—.

Se desconoce su constitución química, y se cree sea una proteína. Elvehjem y colaboradores sospechan que está enlazada a un grupo flavínico (79); parece probable que la succinodeshidrogenasa y la fumaratohidrogenasa sean un mismo fermento aloxacínico (80).

Actúa en conexión directa con el citocromo (81) y (82), al que reducen sin necesidad de transportador intermedio. Sin embargo, se sospecha que quizás haya algún factor que conecte ambos sistemas de oxidación y reducción (83), (84) y (85). A este factor hipotético se le da el nombre de *factor S₂* o *coenzima protídica*. A través del fumarato, la succinodeshidrogenasa oxida al hidruro de coenzima I, porque éste reduce previamente el fumarato a succinato; por la misma razón, a través del fumarato la succinodeshidrogenasa oxida la forma *leuco* del fermento amarillo.

Szent-Györgyi atribuye a la succinodeshidrogenasa un importante papel en la respiración celular y en el metabolismo de glúcidos. El sistema ácido succínico \rightleftharpoons ácido fumárico, sirve, precisamente, de enlace en la cadena de reacciones que conduce a la oxidación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Su potencial redox (88) es cero a pH = 7 y t = 38°.

Lácticodeshidrogenasa de levaduras

Oxida el ácido l-(+)-láctico en ácido pirúvico, así como algunos α -oxiácidos de la misma configuración

Bernheim (89) y Stephenson (90) obtuvieron disoluciones acuosas de este fermento a partir de levadura y de algunas bacterias. Recientemente se ha preparado puro (91).

No se conoce su estructura; se supone sea una proteína carente de grupo prostético. Reacciona directamente con el citocromo, sin necesidad de transportador intermedio, y es la única deshidrogenasa de esta clase que se disuelve en agua. No debe confundirse con la láctico-deshidrogenasa animal, que requiere coenzima I.

α -glicerofosfatodeshidrogenasa II.

Oxida al ácido l-(+)- α -glicerofosfórico en aldehído-3-fosfoglicérico, pero es inactiva frente al d-(—)- α -glicerofosfórico, y al β -glicerofosfato. Se encuentra en tejidos animales, especialmente en cerebro, músculo, hígado y riñón; también la hay en bacterias y levaduras.

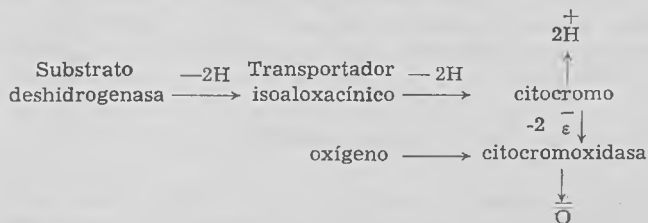
No se disuelve en agua, por lo que no se ha podido separar de la estructura celular. Green (92) demostró que la enzima reacciona directamente con citocromo-c, sin transportador intermedio alguno. Reduce los sistemas redox con potenciales superiores a —0,200 volt.; el del glicerofosfato importa $E'_{0} = -0,250$ volt.

No debe confundirse con la α -glicerofosfato-deshidrogenasa I, que requiere coenzima I y es soluble.

b) DESHIDROGENASAS CON GRUPO PROSTETICO ALOXACINICO

Las deshidrogenasas de este grupo poseen un cofermento de anillo aloxacínico: el *isaloxacín — adenín — dinucleótido*, que se reseñará en el capítulo de «Transportadores». La apodehidrogenasa se une a él con enlace fuerte, de modo que el fermento completo no se disocia fácilmente ni separa sus componentes mediante diálisis.

sis. Las deshidrogenasas de este tipo utilizan su grupo prostético como transportador único de hidrógeno; a través de él transfieren este elemento, unas veces directamente al oxígeno, en cuyo caso se forma agua oxigenada, y otras, indirectamente, por intermedio del citocromo, con lo que se separa agua como producto final de oxidación. De aquí que se conozcan con el nombre de deshidrogenasas aerobias. La ecuación esquemática de oxidación se expresa así:



Entre las deshidrogenasas de este grupo se incluyen la xantinodeshidrasa o aldehidodeshidrogenasa, la d-aminoácidoxidasas y la l-aminoácidoxidasas. Otros fermentos de tipo isoaloxacínico actúan únicamente como transportadores.

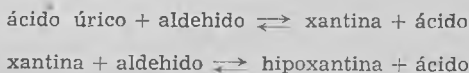
Xantinodeshidrogenasa o aldehidodeshidrogenasa.

En 1902, Schardinger (93) observó que cuando se añade aldehído fórmico y azul de metileno a leche fresca, en ausencia de oxígeno, el color azul del colorante desaparece, produciéndose su forma *leuco* y ácido fórmico. Schardinger atribuyó la descoloración a la actual *aldehidodeshidrogenasa* o *enzima de Schardinger*. Posteriormente se descubrió que este fermento oxida también la hipoxantina y xantina a ácido úrico (94) y (95); de aquí que se le llame *xantinodeshidrogenasa*. Se encuentra en la leche, hígado y otros tejidos. No se halla en los vegetales, pues la aldehidodeshidrogenasa de las plantas oxida aldehídos, pero no purinas.

Tienen color amarillo oscuro. Peso molecular, según Ball, 74.000. El CNH la inhibe cuando el aceptor es el oxígeno y actúa a través del sistema citocrómico, pero no cuando oxida por intermedio del azul de metileno. Es inerte para el CO, SH₂ y los pirofosfatos.

Posee poca especificidad; lo mismo deshidrogena las formas enólicas de la xantina e hipoxantina que los aldehídos acíclicos y cíclicos en estado de hidratos (96). Oxida también al hidruro de coenzima I, así que en ciertos casos actúa únicamente como transportador (97). El potencial redox del sistema xantina \rightleftharpoons ácido úrico es $E'_{0} = -0,361$ volt.; y el del sistema hipoxantina \rightleftharpoons xantina, $E'_{0} = -0,371$ volt.; uno y otro a pH = 7 y t = 30°, según medidas de Green.

La xantinodeshidrogenasa provoca dismutación de xantina a hipoxantina y ácido úrico; y como el aldehído es un substrato para este fermento, producen las dos dismutaciones siguientes:



No cataliza la dismutación del aldehído en alcohol y ácido, que es obra de las *mutasas* en presencia de coenzima I.

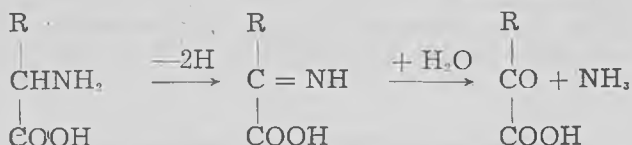
El grupo prostético de la xantinodeshidrogenasa es un falso *iso-aloxacin-adenin-dinucleótido*, y la apodehidrasa una globina.

Aldehidodeshidrogenasa del hígado

Oxida los aldehidos a ácidos con oxígeno como aceptor. Se halla en el hígado de los lactantes, de donde se obtuvo (100). En opinión de Green, es un aloxacín-adenín-dinucleótido. Dixon la cree idéntica a la xantina-deshidrogenasa; en cambio, Bernheim asegura que no oxida la xantina; las diferencias, si existen, quizás puedan estribar en la proteína.

d-aminoácidoxidasa.

Oxida los *d*-aminoácidos no naturales y los convierte en α -cetoácidos. Dicha reacción va acompañada de desprendimiento de amoníaco y se efectúa conforme al esquema:



Abunda en el riñón e hígado y la hay en la mucosa intestinal. Se obtiene a partir de estos materiales (101) y (102).

La *d*-aminoácidoxidasa es un proteido de grupo prostético isoaloxacín-adenín-dinucleótido (103). Negelein y Brömel (104) prepararon la apoenzima y estudiaron sus propiedades. Parece probable que haya varias *d*-aminoácidoxidasas, cuyas diferencias se atribuyen a la distinta autoxidabilidad de las proteínas (105). En todas ellas, la unión de proteína y grupo prostético es reversible, y más débil que en el viejo fermento amarillo.

l-aminoácidoxidasa.

Oxida los *l*-aminoácidos naturales y no reacciona con los *d*-aminoácidos. Se encuentra en riñón e hígado, pero su concentración en los tejidos animales es menor que la de *d*-aminoácidoxidasa. Green (106) la obtuvo en 1944 a partir de hígado y riñón de rata. El preparado cataliza la oxidación de un buen número de *l*-aminoácidos a cetoácidos. Se admiten varias *l*-aminoácidoxidasas (107) y (108), y se supone que todas tienen grupo prostético de naturaleza flavínica.

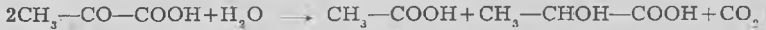
A pesar de la presencia de *l*-aminoácidoxidasa, la oxidación de los aminoácidos naturales tiene lugar en los tejidos animales, en su mayor parte, mediante cooperación de las aminoferasas con la glutámico-deshidrogenasa, en presencia de pequeñas cantidades de ácido *l*-(+)-glutámico, que se comporta como catalizador (109).

c) DESHIDROGENASAS CON GRUPO PROSTETICO THIAMINICO

El grupo prostético de los fermentos incluidos en este apartado es el mismo que el de la carboxilasa, el pirofosfato de aneurina; y la única deshidrogenasa de interés, la pirúvico-deshidrogenasa.

Pirúvicodeshidrogenasa.

En medio anaerobio transforma el ácido pirúvico en ácidos acético y láctico con desprendimiento de gas carbónico. La reacción consiste en una descarboxilación y dismutación que, a la vez que oxida el aldehído producido en la primera fase, reduce a otra mol. de ácido pirúvico (110).



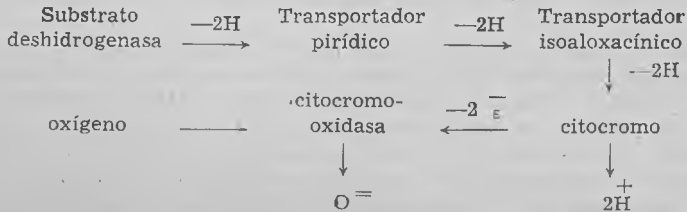
En cambio, en medio aerobio se produce ácido acético y gas carbónico. A propósito de la oxidación del ácido pirúvico se interpretará el mecanismo de acción de la pirúvicodeshidrogenasa.

Se encuentra en bacterias. Embden y Hoppenheimer la han hallado en tejidos animales. Su grupo prostético es el difosfato de thiamina, a través del cual conduce el hidrógeno a transportadores flavínicos, según algunos investigadores.

d) DESHIDROGENASAS CON GRUPO PROSTETICO PIRIDICO

Comprende este apartado numerosos e importantes fermentos deshidrogenantes. Todos constan de una proteína específica y de un cofermento de naturaleza pirídica. En unos casos, éste es el difosfo-piridín-nucleótido, que se conoce con los nombres de *coenzima I*, *cozimasa* o *codehidrasa I*, y representa por los símbolos CoI o bien DPN. En otros el grupo prostético es el trifosfo-piridín-nucleótido, *coenzima II* o *codehidrasa II*, y se indica con el símbolo CoII o bien TPN. En estos fermentos, la unión entre proteína y grupo prostético es muy débil y el holofermento se disocia fácil y totalmente; además, como quiera que la proteína no se disuelve en agua y la coenzima sí, ambos cofermentos pueden separarse mediante diálisis.

Constituyen el grupo de las deshidrogenasas anaerobias o anoxitropas, pues los hidruros de su cofermentos no se oxidan con oxígeno ni directamente ni a través del citocromo; por esta razón, sólo actúan en medio aerobio cuando se interpone un transportador aloxacínico entre ellas y el oxígeno. En cambio, se oxidan con diversos metabolitos, lo que explica su intervención en la mayoría de las reacciones de óxido-reducción propias de la anaerobiosis. El esquema oxidativo en medio aerobio se expresa como sigue:



El cuadro adjunto reseña las principales deshidrogenasas de este grupo, con indicación de la coenzima que cada una de ellas utiliza.

DESHIDROGENASAS CON COENZIMA

DESHIDROGENASA	COENZIMA	REACCION
Alcohol-deshidrogenasa	Co I	Alcohol \rightleftharpoons aldehido.
β - hidroxibutirico - deshidrogenasa	Co I	Ac. β -hidroxibutírico \rightleftharpoons ác. acetacético.
Láctico-deshidrogenasa animal ...	Co I	Ac. láctico \rightleftharpoons ác. pirúvico.
Málico-deshidrogenasa	Co I	Ac. málico \rightleftharpoons ác. oxalacético.
Triosafosfato-deshidrogenasa	Co I	Ald.-1-3-difosfoglicérico \rightleftharpoons ác.-1-3-difosfoglicérico.
α -glicerofosfato-deshidrogenasa I...	Co I	Ac. glicerofosfórico \rightleftharpoons ald. fosfoglicérico.
Glucosa-deshidrogenasa	Co I	Glucosa \rightleftharpoons ác. glucónico.
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa ...	Co II	Hexosa-6-fosfato \rightleftharpoons ác.-6-fosfohexónico.
Acido fosfohexónico - deshidrogenasa	Co II	Ac. fosfohexónico \rightleftharpoons ác. fosfopenónico.
Isocítrico-deshidrogenasa	Co II	Ac. isocítrico \rightleftharpoons ác. oxalsuccínico.
Glutámico-deshidrogenasa	Co I Co II	Ac. glutámico \rightleftharpoons ác. iminoglutámico.

Alcohol-deshidrogenasa.

Cataliza la reacción reversible alcohol etílico \rightleftharpoons acetaldehido. Warburg la designa *aldehido-reductasa*, por ser la deshidrogenasa que provoca la fermentación alcohólica.

Abunda en el hígado y menos en riñón y otros tejidos; también la contienen algunas levaduras y bacterias. Wulf y Negelein (III) la obtuvieron cristalizada a partir del jugo de levadura. Actúa en presencia de coenzima I (112). La inhiben el aldehido acético, los uretanos y el ácido iodoacético.

Según Euler, el equilibrio de la reacción está desplazado hacia la producción de alcohol. Por esto, y porque durante la fermentación alcohólica abunda el hidruro de codehidrasa procedente de la oxidación del triosafosfato por el sistema triosafosfato-deshidrogenasa-coenzima I, el aldehido se reduce casi íntegramente. Para valores elevados de pH la deshidrogenación del alcohol es más rápida que la hidrogenación del aldehido, ocurriendo lo contrario en medios ligeramente ácidos.

A pH = 7 y 35° de temperatura, el potencial redox del sistema alcohol etílico \rightleftharpoons acetaldehído, según medidas de Wurmser (113), importa $E'_0 = -0,237$ volt.; en cambio, las medidas de Adler (114) le asignan el valor $E'_0 = -0,190$ volt., que es el generalmente adoptado.

β - hidroxibutíricodeshidrogenasa.

Oxida el ácido 1-(—)- β -hidroxibutírico a ácido acetilacético (115), (116) y (117). Se halla en el corazón, hígado, riñón y músculo; en algunas bacterias y levaduras. La inhiben el ácido adenílico y el ácido acetoacético. Emplea coenzima I.

El potencial redox del sistema hidroxibutirato \rightleftharpoons acetato, a 33° y pH = 7, importa $E'_0 = -0,282$ volt. (118). El número es bastante más negativo que el del sistema lactato-piruvato y el del malato-oxalacetato; por tanto, piruvato y oxalacetato deben ser reducidos por β -hidroxibutirato; y, en efecto, Dewan y Green han logrado dismutaciones en las que el sistema hidroxibutirato-acetoacetato reduce la coenzima, cuyo hidruro es oxidado después por piruvato u oxalacetato y la deshidrogenasa propia.

La β -hidroxibutíricodeshidrogenasa desempeña importante papel en el metabolismo de los ácidos grasos.

Lácticodeshidrogenasa animal

Oxida el ácido láctico a pirúvico y la reacción es reversible en presencia de coenzima I (119). Abunda en el músculo estriado, corazón, hígado y otros tejidos animales (120) (121) y (122). En 1940, Straub la obtuvo cristalizada partiendo del músculo cardíaco de buey (123).

Euler y colaboradores (124) han comprobado que la reacción

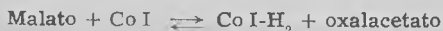


es reversible, pues en ausencia de otros oxidantes del hidruro de codehidrasa I, éste reduce piruvato a lactato, lo que significa que el piruvato puede aceptar hidrógeno de otros substratos a través de coenzima I. Así sucede en la glucólisis del músculo, donde el hidrógeno arrancado a la triosafosfato por su deshidrogenasa, reduce el ácido pirúvico a ácido láctico. El equilibrio está desplazado hacia el lactato, pero se puede correr en sentido contrario agregando CNH, que reacciona con el ácido pirúvico.

El potencial redox del sistema lactato-piruvato lo determinó Szent-Györgyi (125) con lácticodeshidrogenasa del músculo cardíaco; su valor a pH = 7 y $t = 37^\circ$ es $E''_0 = -0,180$ volt. (126). No debe confundirse la lácticodeshidrogenasa animal con la de levadura. Aquella requiere codehidrasa I y ésta carece de grupo prostético.

Málicodeshidrogenasa.

Cataliza la reacción reversible malato \rightleftharpoons oxalacetato según la ecuación



que requiere codehidrasa I (127). Fué descubierta por Thunberg (128), Batelli y Stern (129). Hállase en casi todos los tejidos animales, en las levaduras, bacterias

y algunas semillas. Straub (130) la prepara a partir del músculo cardíaco de diversos animales

Es específica del ácido 1-(—) málico y no reacciona con su inverso óptico. La inhibe el ácido adenílico y su derivado adenosinatrifosfato. El potencial redox del sistema malato-oxalacetato importa, a $\text{pH} \approx 7$ y $t = 37^\circ$, $E'_0 = -0,170$ volt., según medidas de Laki (131), y $E'_0 = -0,102$ volt., según las de Lehman (132).

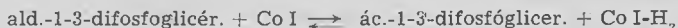
Ofrece considerable interés, porque la deshidrogenación del ácido málico constituye un peldaño en el metabolismo de los hidratos de carbono; desempeña papel importante en la respiración celular.

Triosafosfatodeshidrogenasa

Figura entre las más importantes deshidrogenasas de este grupo, ya que en combinación con la alcoholdehidrogenasa o con la lácticodehidrogenasa origina los fenómenos de óxido-reducción que conducen a la fermentación alcohólica, en el primer caso, y a la fermentación láctica y glucolisis del músculo, en el segundo.

Adler y Hughes (133) confirmaron su existencia en el extracto de músculo, y Euler la halló en la levadura. En 1939, Warburg y Christian la obtuvieron cristalizada a partir del jugo de Lebedew (134).

La triosafosfatodeshidrogenasa oxida al aldehído-1-3-fosfoglicérico en ácido-3-fosfoglicérico con formación intermedia de ácido 1-3-difosfoglicérico, y quizás de aldehído-1-3-difosfoglicérico; de aquí que se le llame también aldehído-1-3-difosfoglicérico-deshidrogenasa (135). Para ello requiere codehidrasa I, fosfatos inorgánicos y adenosin-difosfato. Las reacciones se expresan como sigue:



en las que ADP y ATP representan el adenosina-difosfato y el adenosina-trifosfato, respectivamente. De las tres reacciones, la triosafosfato-deshidrogenasa cataliza la segunda, que le da su nombre.

Recientemente, algunos investigadores, entre ellos Meyerhof y colaboradores, ponen en duda la formación del aldehído-1-3-difosfoglicérico, que hasta la fecha no se ha obtenido libre, y explican el origen del ácido-1-3-difosfoglicérico suponiendo que la triosafosfato-deshidrogenasa adsorbe simultáneamente una mol. de aldehído-3-fosfoglicérico y una de fosfato inorgánico, de las que arranca después un átomo de hidrógeno para dejar en libertad ácido-1-3-difosfoglicérico sin producción de aldehído (136). Conviene mencionar que no hay diferencia alguna entre triosadeshidrogenasa y triosafosfato-deshidrogenasa (137); la última deshidrogena las dos triosas, en presencia de fosfatos inorgánicos, con velocidad trescientas veces menor que la aldehído-3-fosfoglicérico-deshidrogenasa.

α -glicerofosfatodeshidrogenasa.

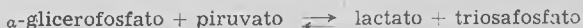
Se conocen dos deshidrogenasas de este nombre: la α -glicerofosfatodeshidrogenasa I, que requiere coenzima I, y la α -glicerofosfato-deshidrogenasa II, que no necesita cofermento y transfiere directamente el hidrógeno al citocromo. Los datos siguientes se refieren al primer fermento citado.

Oxida el D-(—)- α -glicerofosfato a aldehído-3-fosfoglicérico. Se encuentra en los músculos voluntarios y en el músculo cardíaco, de cuyos materiales se obtiene (138).

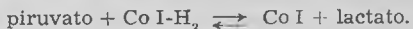
Es una deshidrogenasa altamente específica; sólo actúa sobre el ácido glicerofosfórico natural, pero no sobre su inverso óptico ni sobre el ácido β -glicerofosfórico. El ácido iodoacético no la inhibe. La reacción de oxidación se puede expresar así:



Como el ácido pirúvico oxida al Co I-H_2 , la α -glicerofosfatodeshidrogenasa, en combinación con la lácticodeshidrogenasa, provoca la reacción siguiente:



que es consecuencia de las dos reacciones que siguen (139):



Glucosadeshidrogenasa.

Oxida la glucosa en ácido glucónico. Se halla en el hígado y otros tejidos animales así como en bacterias. Harrison (140) la preparó de extractos de hígado, y recientemente ha sido obtenida pura (141).

Es una proteína fuertemente específica; no actúa sobre fructosa ni galactosa. La inhiben los iones de metales pesados.

Durante mucho tiempo se creyó que la acción deshidrogenante la producía en presencia de codehidrasa I ó II, indistintamente (142). A juicio de Anderson, emplea coenzima I (143), y, según opinión de Das (144), usa coenzima II. Los recientes trabajos de Lynen y Franke (141) comprueban que la glucosadeshidrogenasa pura requiere codehidrasa I. La causa de estas incertidumbres debe atribuirse a la facilidad con que la codehidrasa II pierde ácido fosfórico y pasa a codehidrasa I.

Hexosafosfato-deshidrogenasa.

Constituye el *fermento intermedio* de Warburg («Zwischenferment»); se llama también «Robinson-éster-deshidrogenasa», porque deshidrogena la hexosa-6-fosfato o éster Robinson y la convierte en ácido-6-fosfoglucónico. La reacción es muy específica; el fermento no reacciona con la fructosa-6-fosfato ni con el éster Harden-Young.

Se encuentra en los tejidos animales, sobre todo en músculo e hígado, así como en la levadura. De este último material la obtuvieron Warburg (145), Negelein y Gerischer (146). Es soluble en agua; los iones metálicos pesados y los pirofosfatos la inhiben fuertemente.

La oxidación del éster-Robinson con la deshidrogenasa de la levadura se activa con jugo de eritrocitos de caballo, rico en coenzima II (147). Experimentos posteriores demuestran que la hexosa-fosfato-deshidrogenasa requiere codehidrasa II para ejercer su acción oxidante (148).

La codehidrasa II se regenera tan pronto se pone en contacto de un transportador aloxacínico que oxide el hidruro de codehidrasa II; el transportador, según Haas y colaboradores (149), es un flavoproteína-mononucleótido, la citocromo-c-reductasa, que conduce los electrones al citocromo-c.

Acido-fosfogluconico-deshidrogenasa.

Hállase en la levadura y en tejidos animales. Warburg la obtuvo pura a partir del jugo de Lebedew (150). Oxida al ácido-6-fosfogluconico y produce ácido-2-ceto-fosfogluconico. En opinión de Lipmann (151), este ácido se descarboxila posteriormente y convierte en ácido fosfopentónico, primero, y en ácido fosfoeritrónico, después, hasta pasar finalmente a ácido fosfoglicérico. La ácidofosfogluconico-deshidrogenasa requiere coenzima II.

Isocitrico-deshidrogenasa.

Oxida al ácido l-isocitrico en ácido α -cetoglutárico con formación intermedia de ácido α -ceto- β -carboxiglutárico u oxalsuccínico (152).

Lo que ordinariamente se llama *citrico-deshidrogenasa* es mezcla de *isocitricodeshidrogenasa* y de una hidratasa, la *aconitasa*. Este último fermento transforma el ácido cítrico en ácido l-isocitrico con separación intermedia de ácido cis-aconítico (153).



A 40° y pH = 7,4 se establece un equilibrio entre los tres ácidos durante el cual hay un 80 % de ácido cítrico, 4 % de ácido cis-aconítico y 16 % de l-isocitrico (154). Sobre esta mezcla actúa la isocitrico-deshidrogenasa oxidando el ácido l-isocitrico en ácido oxalsuccínico; después, el ácido oxalsuccínico, por descarboxilación en presencia de la oxalsuccínico-carboxilasa y iones Mg^{++} se convierte en ácido α -cetoglutárico.

La isocitricodeshidrogenasa se halla en casi todos los tejidos animales, en las levaduras, hongos y bacterias y en muchas semillas. Bernheim (155) la obtuvo del hígado, y Thunberg (156) la preparó de semillas de calabaza. En ambos casos, la isocitrico-deshidrogenasa va mezclada a aconitasa.

Sólo actúa con codehidrasa II y en presencia de iones Mg^{++} o Mn^{++} (158). Ochoa (159) ha probado que la isocitrico-deshidrogenasa se enlaza con el sistema citocrómico a través de la citocromo-c-reductasa. La inhiben los iodoacetatos y los pirofosfatos; aquéllos porque se combinan al fermento, y éstos porque precipitan los iones activantes.

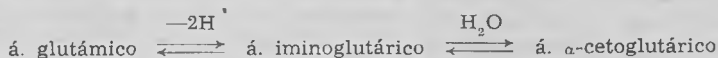
La oxidación del citrato e isocitrato con producción de α -cetoglutarato es un peldaño fundamental en el metabolismo de los hidratos de carbono a través del ciclo de Krebs; de aquí el interés de la isocitrico-deshidrogenasa.

Acido glutámico-deshidrogenasa.

Mientras que el ácido d-(—)-glutámico requiere para su oxidación la d-aminoácido-oxidasa, su inverso óptico, el ácido l-(+)-glutámico, se oxida con la *ácido-glutámico-deshidrogenasa*. Se conocen tres deshidrogenasas de este nombre: la de plantas, que requiere coenzima I; la de levaduras, que exige codehidrasa II; y la de animales, que emplea indiferentemente una u otra coenzima.

La glutámicodehidrogenasa de levaduras, la obtuvo Euler (160) a partir de la levadura de cerveza. Y la de plantas se ha preparado a partir de judías y habas en germinación (161). Dewar (162) ha aislado glutámicodehidrogenasa animal partiendo de tejido hepático.

Cualquiera que sea su procedencia, la glutámicodehidrogenasa oxida al ácido l-(+)-glutámico en ácido α -cetoglutárico, con producción intermedia de un iminoácido, el ácido iminoglutárico, que se hidroliza espontáneamente separando ácido α -cetoglutárico.



La enzima es específica del ácido l-(+)-glutámico. Ningún otro ácido α -cetónico, con excepción del ácido α -cetoglutárico, experimenta una aminación reductora con este sistema enzimático.

La glutámicodehidrogenasa desempeña importante papel en la síntesis de aminoácidos. Porque, como Braunstein y Kritzmann (163), de una parte, y Cohèn (164), de otra, han demostrado, el glutamato reacciona en los tejidos con algunos ácidos α -cetónicos y da lugar por transaminación, a ácido α -cetoglutárico y el aminoácido correspondiente; después, el ácido α -cetoglutárico aprovecha el amoníaco libre del organismo para regenerar ácido glutámico mediante la reacción con la glutámicodehidrogenasa. el ciclo continúa porque el ácido glutámico se comporta como catalizador y no se desgasta. De este modo, con el sistema glutamato \rightleftharpoons α -cetoglutarato se pueden sintetizar numerosos aminoácidos aprovechando los cetoácidos α del metabolismo y el amoníaco libre.

e) DESHIDROGENASAS INCLASIFICABLES

Inclúyense en este grupo aquellos fermentos que se comportan como deshidrogenasas, pero de los cuales poco o nada se sabe acerca de la naturaleza de su grupo prostético o de su modo de acción. Los de mayor interés son: la *monoaminoxidasa*, *diaminoxidasa* y los *ácidos grasos deshidrogenasas*.

Monoaminoxidasa.

Oxida toda clase de aminas, lo mismo acíclicas que cíclicas; primarias, secundarias o terciarias. La que oxida la adrenalina recibe el nombre de *adrenalinooxidasa*. Blaschko y colaboradores (166) descubrieron un fermento en tejidos animales que oxida aminas cíclicas y acíclicas. Todos son, probablemente, la misma enzima: la *monoaminoxidasa*. Se encuentra en hígado, cerebro y riñón, de cuyos materiales la han preparado simultáneamente diversos investigadores (167) y (168)

La oxidación se atribuye a una deshidrogenación.



Se desconoce su naturaleza química y no se sabe si requiere coenzima. Su función fisiológica debe ser meramente desintoxicante, por cuanto destruye las aminas de origen bacteriano que se producen en el intestino.

Diaminoxidasas.

Dásele también el nombre de *histaminasa*, porque no sólo oxida a los compuestos con dos grupos amina (169) sino también a la histamina. La reacción requiere oxígeno y va acompañada de formación de amoníaco y peróxido de hidrógeno. Se encuentra en diversos tejidos animales, sobre todo en riñón e intestino. A diferencia de las aminoácidosdeshidrogenasas, el CNH la inhibe, porque se une a un grupo CO de la enzima.

Las diaminoxidasas se comportan como desintoxicantes: destruyen las diaminas tóxicas que se producen en el intestino grueso durante la descarboxilación de aminoácidos por la acción de bacterias. De aquí que se recomienden preparados de diaminoxidasas para combatir los *choques* anafiláticos, el asma, la fiebre del heno y otros fenómenos de alergia relacionados con la producción de histamina libre.

Zeller (171) cree que la diaminoxidasa pertenece a las deshidrogenasas de grupo prostético flavínico, y Swedin (172) parece haber confirmado esta sospecha.

Acidos grasos deshidrogenasas.

Como su nombre indica, oxidan los ácidos grasos. Se conocen las siguientes:

a) La que oxida el ácido acético a ácido succínico. Se encuentra en el músculo y en el hígado, y fué descubierta por Thunberg (173) y Ahlgreen (174).

b) La que oxida el ácido propiónico a ácido pirúvico. La descubrió Hahn (174), y se halla en tejidos animales.

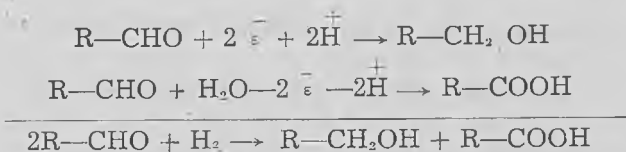
c) Las que oxidan los ácidos grasos superiores en ácidos eténicos. Su conocimiento se debe a Berend y Tangl (175). Una de las mejor estudiadas la describe Lang (176); parece probable que en la oxidación haga falta un cofermento, el ácido adenílico (177). Se han hallado en hígado, riñón, músculo, pulmón y tejido adiposo de ratas (178). No se conoce la naturaleza de ninguna de ellas.

III.—M U T A S A S

Catalizan las *dismutaciones*, lo que significa que simultáneamente oxidan una molécula de un compuesto y reducen otra del mismo cuerpo. La más típica provoca óxido-reducción del aldehído en alcohol y ácido (reacción Cannizzaro). A veces, la dismutación ocurre en la misma molécula, uno de cuyos grupos se oxida y otro se reduce (dismutación interna).

Para interpretar hoy la dismutación, se supone que el compuesto fija una molécula de agua y da lugar a un hidrato; sobre él actúa seguidamente el fermento arrancando dos átomos de hidrógeno y transportándolo a otra molécula del mismo sustrato. Por este mecanismo, la primera se oxida y la segunda se reduce, lo que se ex-

presa diciendo que la dismutación es un fenómeno de óxido-reducción acoplada en medio anaerobio. Con arreglo a la teoría electrónica, la reacción Cannizzaro puede expresarse como sigue:



Algunas dismutaciones no requieren fermento específico, y se interpretan por la acción conjunta de dos deshidrogenasas que actúan con la misma coenzima; ejemplo: la dismutación del aldehído-3-fosfoglicérico en ácido-3-fosfoglicérico y ácido glicerofosfórico. La dismutación, en este caso, es una óxido-reducción que llevan a cabo la triosa-fosfato-deshidrogenasa y la α -glicerofosfato-deshidrogenasa, en colaboración con la coenzima I, común a ambas. En éste y otros casos, precisa que la coenzima reducida por el primer sistema substrato-deshidrogenasa sea oxidada por el segundo sistema substrato-deshidrogenasa (Elliot).

En opinión de Dixon y Lutvak-Mann, las mutasas son complejos enzimáticos con dos centros activos: uno activa el aldehído para su oxidación con coenzima, y otro para la reducción con el hidruro de coenzima (179).

A l d e h i d o m u t a s a

Provoca la dismutación de dos moléculas de aldehído en ácido y alcohol. Los substratos son los aldehídos acíclicos, en particular el acético y el propiónico. Requiere coenzima I (180).

Batelli y Stern (181), de una parte, y Parnas, de otra (182), la descubrieron en 1910 en el hígado y otros tejidos; Neuberg y Hirsch (183) la caracterizaron en las levaduras. Hoy se prepara a partir de hígado (184).

Wieland (185) creyó que la aldehidomutasa es la misma xantinodeshidrogenasa. Sin embargo, la suposición resultó incierta, pues la xantinodeshidrasa o aldehíodeshidrogenasa no provoca dismutaciones de acetaldehído, aun añadiendo coenzima, y la aldehidomutasa purificada no muestra actividad de aldehíodeshidrogenasa. A la aldehidomutasa no la destruyen los cianuros, y a la aldehíodeshidrogenasa, sí. Aquella la inhibe el ácido iodoacético, y a ésta, no. La aldehidomutasa requiere coenzima, y el cofermento de la enzima de Schardinger tiene naturaleza flavínica. Por esto hay que suponer que la aldehidomutasa es un fermento específico peculiar de la dismutación de aldehídos; o bien suponerla constituida por la mezcla de alcohol-deshidrogenasa, coenzima I y una *aldehído-deshidrogenasa* distinta del fermento de Schardinger. Por ahora, dicho fermento no ha sido aislado.

G l i o x a l a s a .

Provoca la dismutación interna del metilglioxal o del fenilglioxal.

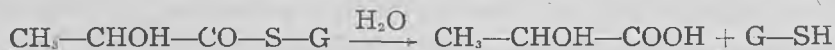


La hay en hígado, riñón y músculo; en los eritrocitos y en la levadura; fué descubierta, en 1913, por Neuberg (186), Dakin y colaboradores (187). La inhiben los iodoacetatos y algunos iones metálicos.

La glioxalasa actúa con glutathión como coenzima (188) y la reacción se interpreta suponiendo que el cofermento se une al substrato con producción de un complejo intermedio lábil (189).



Para la ruptura del compuesto, así formado, hace falta un fermento que fije el hidrógeno arrancado por la glioxalasa a la función alcohólica y lo transporte al grupo cetónico próximo; se sospecha que dicho fermento obra en presencia de coenzima II. Finalmente, una hidrólisis enzimática regenera glutathión reducido y da lugar a ácido láctico.



Antes, cuando se creía que el metilglioxal era uno de los productos intermedios del metabolismo de carbohidratos, atribuíase a la glioxalasa un papel fundamental en la formación de ácido láctico. Hoy, con la pérdida de interés del metilglioxal, se ignora qué misión puede desempeñar este fermento.

IV.—TRANSPORTADORES

En la oxidación celular, cualquiera que sea el aceptor definitivo de hidrógeno, lo mismo en medio aerobio que anaerobio, las deshidrogenasas actúan en coordinación con los *transportadores de hidrógeno*. La mayoría de ellas son incapaces de transferir directamente este elemento del substrato al oxígeno o al metabolito que reducen, y requieren un cofermento que, *momentáneamente*, obra de aceptor de hidrógeno, pero que, en realidad, es un transportador que lo dirige en busca del aceptor definitivo. Así, la lácticodeshidrogenasa animal, con ayuda de codehidrasa I, transfiere hidrógeno desde el substrato al fermento amarillo, de donde pasa al citocromo, y allí, activado ya, al oxígeno, activado a su vez por la citocromoxidasa. La codehidrasa I, el fermento

amarillo y los citocromos, son, en este caso, los transportadores que transfieren el hidrógeno desde la deshidrogenasa a la oxidasa.

¿Existe, en realidad, diferencia entre transportadores y deshidrogenasas? Si la hay, no debe buscarse en materia esencial; porque si las deshidrogenasas activan el sustrato y le arrancan hidrógeno, los transportadores activan la coenzima o el transportador adyacente y lo oxidan. Los transportadores son sistemas de oxidación y reducción y actúan en dos formas: una oxidada y otra reducida; es decir, constituyen verdaderos sistemas redox. El potencial de oxidación y reducción de cada transportador debe ser intermedio entre el del sustrato o transportador que le precede y el del transportador o sistema oxidásico que le sigue. En el ejemplo anterior, el fermento amarillo actúa de transportador entre codehidrasa I y citocromo, porque su potencial redox está comprendido entre los de estos dos sistemas. A medida que el hidrógeno salta de un transportador a otro, las fuerzas de enlace que unen el electrón al protón se relajan y la relajación es tanto más fuerte cuanto más positivo sea el potencial redox del transportador atravesado. Cuando dicho potencial alcanza determinados valores, el electrón se desliga del núcleo atómico y el hidrógeno se ioniza; por eso, a través de los citocromos, tan sólo circulan electrones con dirección a la citocromoxidasa.

Hay transportadores cuyos hidruros son autooxidables, y otros que carecen de esta propiedad. Los hidruros del primer tipo, en contacto del oxígeno molecular, producen peróxido de hidrógeno; en cambio, cuando se oxidan a través del sistema citocromo-oxidasa, separan agua. Los transportadores cuyos hidruros no son autooxidables se oxidan en la reacción con algún metabolito; o con el oxígeno, en este caso a través de un transportador del primer tipo que lleve el hidrógeno hasta él.

Los transportadores autooxidables son sistemas de óxido-reducción de tipo electroactivo; entre ellos se incluyen los de anillo isoaloxacínico. Los no autooxidables pertenecen a los sistemas de tipo perezoso, y son sus mejores representantes las coenzimas I y II.

Acéptase comúnmente que el transporte de hidrógeno tiene lugar por pares de átomos; la teoría de Michaelis (190), o de transporte por átomos aislados encontró hasta hace poco escasos adeptos, pues sólo en contados casos había pruebas experimentales de que en las oxidaciones se formaban radicales libres, aunque la cinética de algunos fenómenos elementales los haga probables (191).

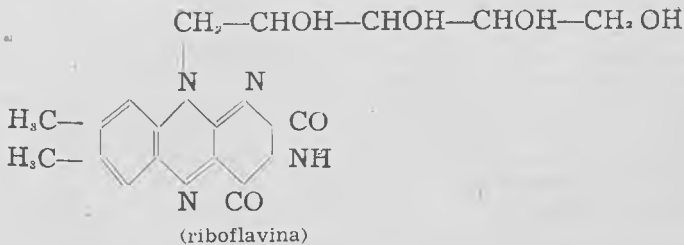
Para que las deshidrogenasas actúen en medio anaerobio, precisa que su cofermento sea un aceptor no autooxidable, capaz de ceder su

hidrógeno al metabolito que haya de reducirse. En la aerobiosis, en cambio hace falta que a continuación del transportador no autooxidable, si lo hay, encuentre el hidrógeno otro transportador autooxidable, por ejemplo, una flavienzima, que lo conduzca al oxígeno o al sistema citocrómico. Como ya se indicó, cuando el transportador flavínico cede su hidrógeno directamente al oxígeno molecular, prodúcese peróxido de hidrógeno; en cambio, si lo transfiere al citocromo se separa agua como producto de reacción. El primer mecanismo es lento y sólo adaptable a bacterias y seres inferiores. Por el contrario, el segundo es rápido, y con él se lleva a cabo la respiración celular de los organismos superiores.

La mayoría de los transportadores de hidrógeno conocidos poseen actividad enzimática. Trátase de proteidos en los que el grupo prostético constituye la parte activa y eficiente del transportador. En ellos, al igual que en las deshidrogenasas, la proteína muestra marcada especificidad de substrato. Proteína y grupo prostético se unen en los transportadores con enlace fuerte y consistente, unas veces, y con ligazón tan lábil, otras, que fácilmente cambian de compañero. En los transportadores del último tipo, un mismo grupo prostético puede transferir hidrógeno entre distintos compuestos con sólo variar la proteína a que se enlace, pues según la naturaleza de la proteína así es también el potencial redox del transportador. Entre los transportadores enzimáticos los hay de grupo prostético, pirídico, aloxacínico, tiazólico y hemínico. También se conocen transportadores de carácter no enzimático; son compuestos que captan y ceden hidrógeno con facilidad. Entre otros, merecen citarse los ácidos bibásicos de cuatro carbonos, los ácidos cetónicos e hidroxiacidos, el glutathión, el ácido ascórbico, los difenoles y algunos más.

a) TRANSPORTADORES ALOXACINICOS O FLAVINICOS

En la leche, hígado, orina, heno, etc., se encuentra una sustancia amarilla, que presenta fluorescencia verdosa, y cuya banda de absorción visible se halla en la región del espectro de 4450 Å. Esta sustancia es la vitamina B₂, lactoflavina o riboflavina. Su estructura corresponde a la 6, 7-dimetil-9-(1-d-ribitil)-isoaloxacina, y su fórmula la que indica el esquema adjunto. Interesa anotar que la cadena enlazada al eslabón 9 no es la de d-ribosa, sino la de d-ribitol; por tanto, la vitamina B₂ debía llamarse ribitilflavina en lugar de riboflavina, que es inadecuado. Los agentes reductores la descoloran, porque fijan una molécula de hidrógeno y la convierten en leucoflavina; pero en contacto de aire u otro oxidante la leucoflavina recobra el color amarillo y regenera riboflavina.



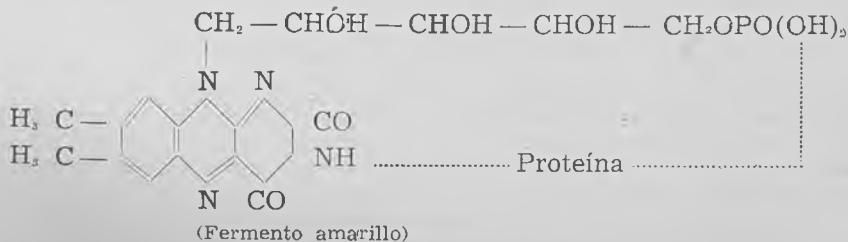
Cuando la riboflavina esterifica el carbono-5 del d-ribitol, produce un éster fosfórico de la riboflavina, al que impropriamente se considera como mononucleótido cuando en realidad el azúcar está reemplazado por un alcohol, el d-ribitol. En esta forma suele también encontrarse la riboflavina en el organismo; en él la esterificación se realiza en el epitelio intestinal.

A los compuestos de las proteínas con el éster fosfórico de la riboflavina se les llama *fermentos isoaloxacínicos* o *amarillos*. El primero conocido fué el *fermento amarillo de oxidación*. Warburg y Christian lo aislaron en 1932 a partir de la levadura (192) y (193). De entonces acá se han obtenido alrededor de diez fermentos de tipo aloxacínico; todos poseen color amarillo; algunos se comportan como verdaderas deshidrogenasas, y todos como transportadores de hidrógeno. Tales fermentos son los siguientes: *fermento amarillo de oxidación* o *viejo fermento amarillo*, *xantinodeshidrogenasa*, *diaforasa*, *d-aminoácidoxidasas*, *l-aminoácidoxidasas*, *fermento sintético de Warburg y Christian*, *fermento de Haas*, *fermento de Corran y Green*, *glucosa-oxidasa de mohos*, *fumárico-hidrogenasa* y *citocromo-c-reductasa*.

El grupo prostético del fermento amarillo de oxidación y de la citocromo-c-reductasa es un falso mononucleótido de composición *isoaloxacina-d-ribitol-fosfato*; y el de los restantes, un falso dinucleótido, compuesto de *isoaloxacina-d-ribitol-fosfato-fosfato-d-ribosa-adenina*.

En los fermentos amarillos, la unión de la proteína con el grupo prostético se efectúa, según Theorell (194) y Kuhn (195), mediante un OH del ácido fosfórico y el grupo NH del anillo isoaloxacínico; lo prueba así su falta de fluorescencia; esta unión es más fuerte en las flavoproteínas-dinucleótidos que en las de tipo mononucleótido.

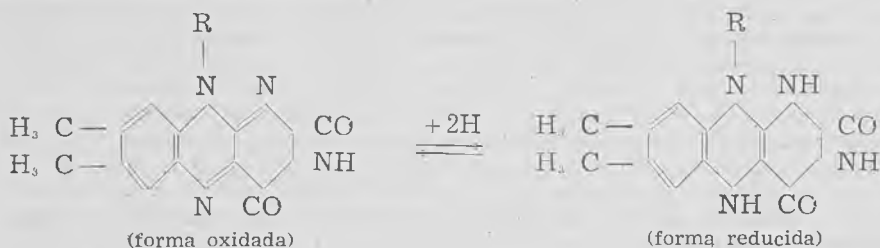
Las flavoproteínas pertenecen a los sistemas de óxido-reducción electroactivos; son, efectivamente, autooxidables en su forma *leuco*, y transfieren electrones entre sistemas de óxido-reducción de tipo perezoso. Ahora bien, para que los fermentos flavínicos transfieran hidrógeno, precisa que las posiciones 6 y 7 se hallen ocupadas en la riboflavina por grupos metílicos; el desplazamiento de estos grupos a los eslabones 5 y 8, respectivamente, suprimen la acción transportadora. Hace falta, asimismo, que el grupo NH del eslabón 3 se encuentre libre, con el fin de unir por él la proteína y el ácido fosfórico.



El potencial redox depende de la naturaleza de la cadena que se inserte en el

eslabón 9; sólo el d-ribitol y la l-arabinosa prestan al anillo isoaloxacínico el carácter de cofermento; los grupos metilos de los eslabones 6 y 7 elevan el valor de su potencial redox. La riboflavina, lo mismo que las ferroporfirinas, modifican su potencial redox en la unión con la proteína; así, el de la riboflavina es $E'_0 = -0,185$ volt.; y el del fermento amarillo, $E'_0 = -0,060$ volt. Seguramente que éstas y otras causas alteran sensiblemente las características de los diferentes fermentos aloxacínicos, determinando su modo de comportarse.

Los hidruros de codehidrasa I y II reducen a los fermentos flavínicos, por cuanto les ceden dos átomos de hidrógeno o, mejor dicho, dos electrones y un ion H^+ , pues el otro ion H^+ lo toman del medio exterior; de esta manera, aquéllos se oxidan a codehidrasa I y II, respectivamente, y el fermento flavínico pasa a la forma leuco (196). También los reducen los d- y l-aminoácidos, la xantina e hipoxantina y algunos aldehídos. En todo caso, cada flavoproteína es específica para algunos de estos substratos. El mecanismo de reducción se interpreta con el adjunto esquema, en el que sólo se indican los anillos de la aloxacina; los dos átomos de hidrógeno se fijan en los eslabones 1 y 10, y la formación de hidruro va acompañada de cambio en la estructura.



Las leuco-flavo-proteínas, lo mismo las de tipo mononucleótido que las de tipo dinucleótido, son tan poco autooxidables a la presión ordinaria que la reacción no ofrece interés fisiológico. En cambio, los citocromos las oxidan con rapidez, y en la oxidación la molécula de hidrógeno transferida por el fermento cede al citocromo sus dos electrones y separa dos iones H^+ (197) y (198). Es muy probable que la cesión de electrones no se efectúe por pares, sino uno a uno; en ese caso, la flavoproteína dará lugar a un compuesto intermedio de estructura semi-quinoida y muy inestable (Michaelis).

A juicio de Barrón (199), los fermentos flavínicos de tipo mononucleótido efectúan la transferencia de electrones al citocromo-c, y los de tipo dinucleótido, al b; de la misma opinión participa la escuela japonesa de Okunuki y Yakushiji (200)

Fermento amarillo de oxidación.

El fermento amarillo de oxidación de Warburg y Christian, o viejo fermento amarillo, resulta en la unión de una proteína específica con el éster fosfórico de la riboflavina; se trata, por tanto, de un fermento con grupo prostético de tipo isoaloxacín-mononucleótido o isoaloxacín-ribosa-fosfato.

No se ha encontrado en tejidos animales. Warburg y Christian (201) lo aislaron de la levadura, y Theorell (202) lo obtuvo cristalizado en agujas amarillo anaranjadas.

El potencial redox del fermento amarillo importa $E_0 = -0,060$ volt. a $\text{pH} = 7$ (203).

Laki (204) supone que el viejo fermento amarillo, de oxidación, en su forma *leuco*, transfiere hidrógeno del ácido málico al fumárico, puesto que su potencial redox está comprendido entre el del sistema ácido succínico \rightleftharpoons ácido fumárico, $E'_0 = -0,011$ volt. y el potencial redox del sistema ácido málico \rightleftharpoons ácido oxalacético, para el que $E'_0 = -0,169$ volt.

Se oxida y reduce con relativa lentitud; alrededor de 50 veces por minuto (205); constituye, por tanto, un transportador poco eficaz. Probablemente es un producto de descomposición de otros fermentos flavínicos, quizá de la citocromo-c-reductasa, que perdieron eficacia al separarse de ellos una mol. de adenín-mononucleótido.

D i a f o r a s a .

La *diaforasa* de Euler y colaboradores (*factor coenzima* de Dewan y Green) la descubrieron H. von Euler y Hellström (206), de un parte, y Dewan y Green, de otra (207). Transfiere hidrógeno desde los hidruros de coenzima I y II al citocromo. En opinión de eminentes investigadores, la oxidación aerobia de numerosos substratos que requieren codehidrasas para su deshidrogenación, tiene lugar en los tejidos animales a través de la diaforasa, pues el viejo fermento amarillo sólo se encuentra en levaduras y bacterias. En cambio, Szent-Györgyi no admite la existencia de esta enzima. Otros científicos creen que la transferencia de hidrógeno la efectúa la citocromo-c-reductasa I ó II.

Se encuentra muy esparcida por los tejidos animales, particularmente en el músculo cardíaco, riñón y glóbulos rojos; la hay también en bacterias, levaduras y plantas superiores. Se ha preparado a partir de músculo cardíaco de buey.

La diaforasa no se disuelve fácilmente, sino que permanece unida a los componentes insolubles de la célula. Straub (209), sin embargo, obtuvo una diaforasa soluble, de color amarillo y fluorescencia verde. Es termostable: calentada a 60° no se destruye.

Hoy se admiten dos diaforasas (210): una que oxida a la coenzima I, y otra a la coenzima II. Las dos diaforasas poseen grupos prostéticos de aloxacín-adenín-dinucleótido, estimándose que su diferencia radica en la naturaleza de la apoenzima. En opinión de Straub (211), el grupo prostético de las diaforasas es el mismo de la d-aminoácido-oxidasa, y los dos fermentos sólo difieren en la proteína.

La escuela japonesa (212) sostiene que la diaforasa cataliza la oxidación de las codehidrasas I y II y la reducción del citocromo b, sirviendo de enlace entre ellos; sin embargo, no hay pruebas decisivas que confirmen esta suposición.

Las diaforasas son mucho más activas que el viejo fermento amarillo. A 38° cada mol. de diaforasa cataliza la oxidación de 8.500 mol. de hidruro de codehidrasa por minuto. Green y Dewan le atribuyen una actividad mil veces mayor que la de aquel fermento.

Fumárico-hidrogenasa.

En los preparados brutos del viejo fermento amarillo, Fischer y colaboradores (213) encontraron una flavienzima que cataliza la hidrogenación del ácido fumárico a ácido succínico en presencia de algunos colorantes. A este fermento lo llamaron *fumáricohidrogenasa*. Se desdobra fácilmente en proteína y aloxacín-adenín-dinucleótido. Hoy se discute si la fumáricohidrogenasa es o no idéntica con la succino-deshidrogenasa (214) y (215). Se desconoce su papel en el organismo.

Fermento de Hass.

Hass aisló de la levadura (216) un fermento amarillo con grupo prostético isoaloxacín-adenín-dinucleótido. La proteína no parece igual a la del fermento amarillo clásico. Se disuelve en agua. Del fermento de Hass sólo se sabe que oxida el hidruro de codehidrasa II en presencia de azul de metileno.

Citocromo-c-reductasa.

Hass y colaboradores (217) y (218) descubrieron en las levaduras un fermento amarillo que cataliza la reducción del citocromo-c por el hidruro de coenzima II. Le llaman *citocromo-c-reducasa número 1*, y sirve de enlace entre hidruro de codehidrasa II y citocromo-c (219).

Sus descubridores han comprobado que la citocromo-c-reductasa pierde su capacidad para reducir el citocromo-c cuando se somete a los mismos tratamientos químicos que se emplean para aislar el viejo fermento amarillo, por lo que sospechan que éste no sea más que un producto de desnaturalización de aquélla. Si así es, o si se obtiene algún día de tejidos animales, el papel desempeñado por el viejo fermento amarillo y por la diaforasa quedarían en entredicho.

La reducción del citocromo-c por la citocromo-c-reductasa número 1 es 100.000 veces más rápida que la efectuada por el fermento de oxidación de Warburg. Si se demuestra su presencia en los tejidos animales, se confirmará la sospecha de que la citocromo-c-reductasa debe desempeñar un papel trascendental en la oxidación de substratos que utilizan coenzima II. El grupo prostético del nuevo fermento pertenece al tipo mononucleótido, y es un isoaloxacín-ribosa-fosfato, como el del viejo fermento amarillo. Peso molecular de la citocromo-c-reductasa: 75.000.

Por ahora, sólo se ha aislado de la levadura. Los preparados más puros contienen 98 % de citocromo-c-reductasa (220). Con el citocromo-c reacciona 10⁶ más rápidamente que con el oxígeno molecular.

Casi simultáneamente, Altschul y colaboradores (221) comunicaron el descubrimiento de otra enzima gemelo, que cataliza la reducción de citocromo-c por el hidruro de codehidrasa I; la designan citocromo-c-reductasa número 2. Sirve de enlace entre el hidruro de coenzima I y el citocromo-c. Se ha obtenido de las levaduras de la panificación. Se desconoce su naturaleza y no se tiene seguridad de su acción enzimática.

b) TRANSPORTADORES PIRIDICOS

Pertencen a este grupo la antigua *cozimas*, que Euler designa con los nombres de *coenzima I* o *codehidrasa I*, y la por este mismo autor llamada *codehidrasa II* o *coenzima II*. Actualmente se les da la denominación de *codehidrogenasa I* y *codehidrogenasa II*. Ambos cofermentos están ampliamente distribuidos en los seres vivos, siempre en cantidades pequeñas, en particular la codehidrasa II.

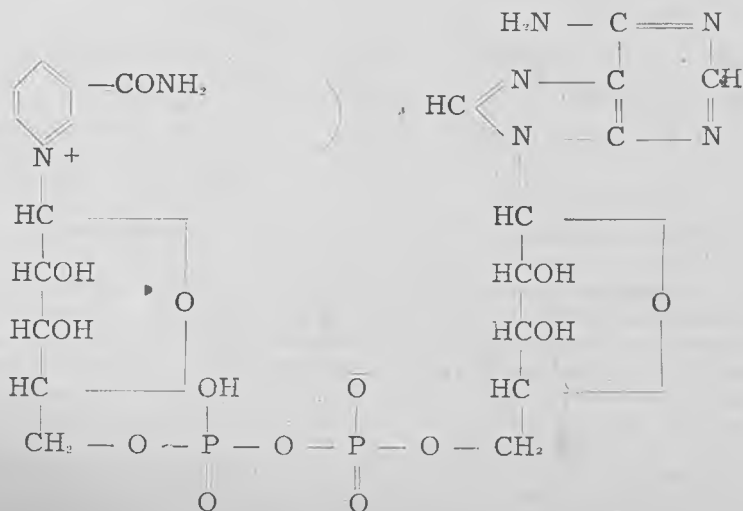
Constituyen el cofermento de numerosas deshidrogenasas, a las que se unen con enlace extraordinariamente lábil. Parnas (22) las llama «coenzimas móviles», distinguiéndolas así de las «coenzimas fijas», a las que pertenecen los transportadores

flavínicos. A causa de la labilidad del enlace, una misma codehidrogenasa cataliza la deshidrogenación de diversos substratos, y acelera la oxidación y reducción de varios pares de sustancias.

Los hidruros de coenzimas I y II no se oxidan directamente con oxígeno molecular, ni indirectamente a través del citocromo—citocromoxidasa (223). Pertenecen a los sistemas de óxido-reducción de tipo perezoso, y para su oxidación requieren un sistema electroactivo, por ejemplo, la diaforasa o la citocromo-c-reductasa (223); de aquí que los fermentos amarillos aparezcan intercalados entre codehidrogenasas y citocromos. También las oxidan algunos metabolitos en presencia de la deshidrogenasa correspondiente; por ejemplo, al hidruro de coenzima I lo oxida el sistema acetaldehído \rightleftharpoons alcohol y su deshidrogenasa (fermentación alcohólica), o el sistema ácido pirúvico \rightleftharpoons ácido láctico y la deshidrogenasa de este nombre (fermentación láctica). El proceso de oxidación y reducción puede seguirse experimentalmente con ayuda de métodos espectrofotométricos; porque la forma oxidada de las codehidrasas muestran una banda de absorción intensa y estrecha en la región de 2.600 Å, banda que en el hidruro está reemplazada por otra de 3.400 Å. La fluorescencia de los hidruros en luz blanca se utiliza también para observar la marcha de la óxido-reducción de codehidrasas (225).

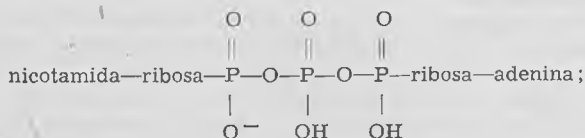
Por ser sistemas de oxidación de tipo perezoso, fracasaron cuantos intentos se han realizado para medir directamente su potencial redox; la medida se logra en presencia de un sistema electroactivo. De este modo se encuentra que los potenciales normales de una y otra codehidrasa oscilan alrededor del valor $E''_0 = -0,270$ volt.

Ambas coenzimas son dinucleótidos de tipo piridínico, puesto que en la hidrólisis separan una molécula de nicotinamida, una de adenina, dos de d-ribosa, y dos o tres de ácido fosfórico, según se trate de codehidrogenasa I o de codehidrogenasa II. Los trabajos de Euler y Myrbäck (226), y los de Euler y Schlenk (227) han puesto en claro que la codehidrogenasa I es el difosfo-piridín-adenín-dinucleótido de la fórmula adjunto indicada. Suele representarse abreviadamente por las letras DPN. Así también, las investigaciones de Warburg y colaboradores (228) permiten afirmar que la codehidrogenasa II es un trifosfo-piridín-adenín-dinucleótido. Se representa abreviadamente por las letras TPN.

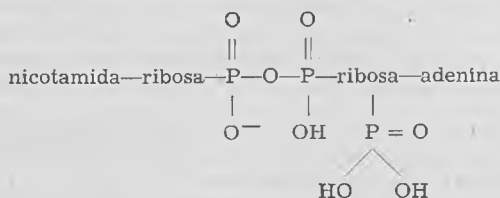


(codehidrogenasa I)

De acuerdo con la hipótesis de Schlenk, se atribuyó, en un principio, a la codehidrogenasa II, la estructura



pero posteriormente, Schlenk (229), ha creído más probable la agrupación

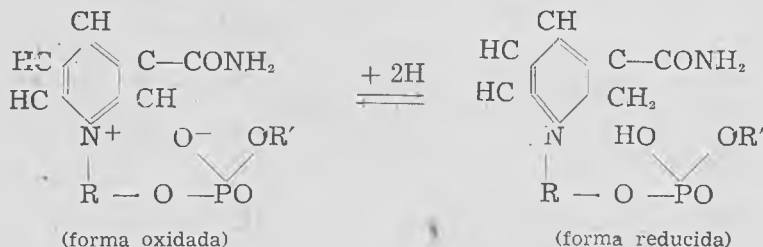


en la que un radical fosfórico está unido a la ribosa del mismo modo que en el ácido adenílico de la levadura.

En opinión de Warburg y Christian (230), el transporte de hidrógeno por las codehidrasas y su paso de la forma oxidada a la reducida, se interpreta admitiendo que un átomo de hidrógeno se fija en el grupo iónico del ácido fosfórico y otro en el eslabón CH del doble enlace que soporta el nitrógeno del anillo pirídico; con lo cual resulta que el anillo pirídico de la codehidrasa transporta dos electrones y un

ión H^+ , mientras que el otro ión hidrógeno queda realmente en el medio exterior.

El esquema adjunto da idea del mecanismo de la oxidación-reducción con codehidrasas; a fin de simplificarlo, sólo se representa el anillo de la nicotamida y el radical fosfato; lo restante se indica con los radicales R y R'.



Ambas codehidrasas pueden transformarse una en otra. El paso se efectúa mediante fosforilación (231) en presencia de adenosina-trifosfato, jugo de levadura y iones magnesio; o con jugo de levadura, hexosadifosfato y fosfatos minerales (232). La conversión de codehidrogenasa II en codehidrogenasa I se realiza en condiciones análogas, lo que demuestra que la reacción es reversible. Estos hechos justifican la inseguridad que todavía reina respecto a la coenzima que requieren algunas deshidrogenasas de grupo prostético pirídico.

La predilección de las apodehidrasas por una o por otra coenzima depende del número de radicales fosfóricos de éstas, pues ni la riboflavina ni la nicotamida-neucleósido se combinan con ellas (233). Algún papel deben desempeñar el nitrógeno del anillo pirídico y los radicales fosfatos, ya que el paso de nitrógeno pen-

tavalente a trivalente y la aparición de un nuevo grupo OH en el radical fosfórico, como tiene lugar cada vez que se efectúa la hidrogenación de la coenzima, modifica la afinidad del grupo prostético con la proteína. También al aminogruppo de la adenina compete alguna misión de interés, porque al sustituirlo por un grupo OH se atenúa fuertemente la actividad de la codehidrasa.

Meyerhof (234) denuncia el hecho de que las coenzimas de tipo pirídico se encuentran en los seres vivos en gran exceso con respecto a las apodehidrasas; al contrario de lo que sucede con los transportadores flavínicos, cuya proporción con la proteína suele ser de 1 : 1. Otros investigadores (235) y (236), recalcan la observación sin llegar a interpretarla.

Codehidrogenasa I o coenzima I

Harden y Young (237) la aislaron en 1904, a partir del jugo de levadura. En 1918, Meyerhof preparó un jugo muscular que poseía la propiedad de transformar el glucógeno en ácido láctico; la reacción exigía cofermento, que se hallaba en el caldo y era igual al del jugo de levadura. Euler y Myrbäck le dieron el nombre de coenzima I (237). Nuevos y mejores métodos de preparación suministran mayores rendimientos (238), (239), (240) y (241).

La codehidrogenasa I se encuentra en todas las células del organismo animal, casi siempre en cantidades pequeñas; las levaduras la contienen en proporciones mayores; veinte kilos de este material proporcionaron a Euler 1,5 gr. de coenzima I (237). Nuevos y mejores métodos de preparación suministran mayores rendimientos (238), (239), (240) y (241).

Es higroscópica, soluble en agua y alcohol, e insoluble en disolventes orgánicos; dializa a través de las membranas. Resiste sin descomponerse temperaturas de 80°. Goza de poca especificidad, pues actúa de coenzima con numerosas deshidrogenasas. La forma oxidada no fluoresce, pero su hidruro ofrece fluorescencia blanca en luz ultravioleta. Su estructura corresponde a la de un difosfo-piridín-adenín-dinucleótido. El potencial redox de la codehidrasa I a pH = 7,2 es, según Ball (242), $E'_0 = -0,260$ volt.; según medidas de Borrock, importa $E'_0 = -0,282$ volt. a 30° y pH = 7.

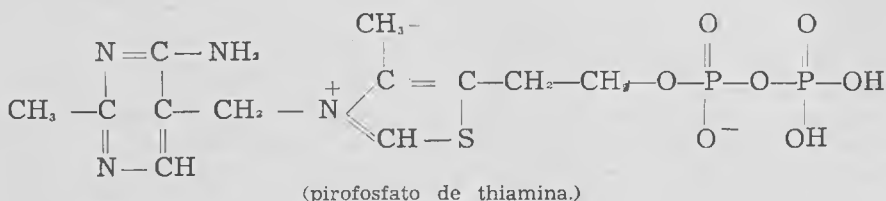
Codehidrogenasa II o coenzima II.

Conócese también con el nombre de *cofermento de Warburg*, por haber sido Warburg y Christian quienes lo descubrieron en los eritrocitos del caballo (243); ellos lo obtuvieron también a partir de este material; 250 litros de sangre de caballo suministran 20 mg. de codehidrasa II.

Es muy resistente a los ácidos y sensible a los álcalis. No presenta bandas de absorción en la porción visible del espectro, pero sí en la del ultravioleta. Su hidruro no es autooxidable; lo oxidan los fermentos flavínicos, en particular la citocromo-c-reductasa número I (244). Goza de poca especificidad, y son varias las apodehidrasas que se unen a dicho aceptor. Su estructura corresponde a la de un trifosfo-piridín-adenín-dinucleótido. Se obtiene por fosforilación enzimática de la codehidrasa I (245) y (246).

c) TRANSPORTADORES DE GRUPO THIAZOLICO

Inclúyense en este reducido grupo de transportadores la *cocarboxilasa* o coenzima de la pirúvicodeshidrogenasa. Trátase de pirofosfato de tiamina, es decir, de un derivado de la vitamina B₁; su estructura, según Williams (247), la expresa la fórmula



Lipmann (248) cree que el pirofosfato de tiamina transfiere hidrógeno del sistema ácido pirúvico—pirúvicodeshidrogenasa a la djaforasa, en una función semejante a la de la coenzima I ó II y con un mecanismo similar. A juicio suyo, el grupo activo para la descarboxilación con la caiboxilasa es el amínico NH₂; en cambio, en la deshidrogenación interviene el nitrógeno pentavalente y el radical del ácido pirofosfórico, sobre los que se fijan los dos hidrógenos arrancados al substrato. Con la opinión de Lipmann coincide Clark (249). Sin embargo, los trabajos comprobatorios han dado resultados negativos, ya que con la fosforilación de la vitamina B₁ crece la resistencia a la oxidación y reducción (Barrón). La forma reducida de la tiamina y de la difosfotiamina no son autooxidables, razón por la cual deben incluirse entre los sistemas de óxido-reducción de tipo perezoso.

Las múltiples funciones catalíticas de la difosfotiamina sugieren la posibilidad de que actúe formando parte de la proteína que activa al sistema que reacciona con piruvato.

d) TRANSPORTADORES DE GRUPO HEMINICO

C i t o c r o m o s .

En 1884, MacMunn descubrió en los músculos un colorante de naturaleza hemínica, que llamó *miohematina* (250). Posteriormente fué hallado en numerosos tejidos, por lo que se le dió el nombre de *histohematina*. Se caracteriza por su espectro de absorción, compuesto de cuatro bandas en la región visible del espectro y tres en la del violeta. Este espectro cambia totalmente cuando se burbujea aire a través de las células que contienen el colorante, lo que revela que la histohematina existe en dos formas: una oxidada y otra reducida.

El descubrimiento de MacMunn quedó olvidado hasta 1925, en que Keilin lo sacó a luz. La histohematina se encuentra en casi todos los tejidos vegetales y animales, en bacterias y levaduras; por esta razón, Keilin la llama *citocromo*, nombre con que actualmente se conoce. Ball y Meyerhof han caracterizado su presencia en animales marinos con pigmento sanguíneo de hemocianina (251).

El espectro de absorción del *citocromo reducido* consta de cuatro bandas en la región visible y tres en la violeta (252). Las longitudes de onda son 6.030-5.630-5.500 y 5.223 Å; se designan con las letras *a*, *b*, *c* y *d*, respectivamente. Las tres primeras bandas presentan contornos bien definidos y corresponden a otros tantos componentes: los *citocromos a*, *b* y *c*, respectivamente. La banda de 5.223 Å, por su complejidad, se supuso resultado de fundir una segunda banda común a los tres citocromos. Las tres bandas de la región violeta tienen longitudes de onda 4.490-4.430 y 4.150 Å, y cada una de ellas corresponde también a uno de los citocromos *a*, *b* y *c*. La de 5.500 Å es, entre todas, la más intensa y estable. El espectro de absorción de los citocromos oxidados aparece difuso y no ofrece interés.

El *citocromo a* se caracteriza por su inestabilidad e insolubilidad. Nada se sabe de su naturaleza. Posee espectro de absorción con bandas de 6.030-5.223 y 4.490 Å; la primera y tercera son exclusivas de él. No es autooxidable; lo oxida la citocromoxidasa. Se supone constituido por una mezcla de tres componentes: los citocromos a_1 , a_2 y a_3 ; pues, aparte de su banda de absorción típica de 6.030 Å, se han percibido otras entre 6.300 y 6.400 Å y una de 5.900 Å (253). Los citocromos a_1 y a_2 no son autooxidables ni se combinan con CNH y CO; en cambio, el a_3 se oxida con el oxígeno molecular y se une a aquellos gases. Sospéchase que el citocromo a_3 sea la propia citocromoxidasa (254). El citocromo *a* ha sido aislado por Yakushiji (255).

El *citocromo b* tiene un espectro de absorción con tres bandas, cuyas longitudes de onda son 5.630-5.300 y 4.330 Å, respectivamente. Tampoco se conoce su naturaleza; sólo se sabe que es un hemocromógeno análogo al de la sangre. En su forma reducida es ligeramente autooxidable, pero se ignora si la citocromoxidasa cataliza o no su oxidación. Lo reduce la diaforasa y los transportadores de tipo isoaloxacín-adenín-dinucleótido, en general. Es muy inestable; con facilidad se altera y destruye. No se disuelve en agua. Bach (256) asegura haber descubierto en la levadura el citocromo b_2 , que Haas cree idéntico con la citocromo-c-reductasa (257). No nos explicamos la hipótesis de Haas si aquél es un fermento hemínico. Hasta la fecha no se ha aislado puro.

El *citocromo-c* es el único estable y soluble, razón por la que se ha preparado en alto grado de pureza. Los primeros trabajos de separación se deben a Keilin (258), que partía de levadura. Posteriormente, Theorell (259) y Keilin (260) lo obtuvieron de riñón y músculo cardíaco de caballo. Muy puro, con 0,43 % de hierro, lo han preparado recientemente Keilin y Hartree (261).

El *citocromo-c* es un polvo rojo pardo, bastante estable al calor. Se disuelve en agua, y sus disoluciones tienen color amarillo rojizo. El espectro de absorción del *citocromo-c reducido* consta de tres bandas, cuyas longitudes de onda son 5.500-5.200 y 4.150 Å; la segunda de ellas es compleja. La forma oxidada ofrece una banda de 5.300 Å, otra en el violeta de 4.000 Å y dos en el ultravioleta (262). A pH comprendidos entre 4 y 12 no es autooxidable. Lo oxida la citocromoxidasa, el peróxido de hidrógeno y el ferricianuro. Lo reducen algunas dehidrasas, por ejemplo la succino-deshidrogenasa en presencia de ácido succínico, y las leucoflavinas de tipo mononucleótido, en particular la citocromo-c-reductasa. También lo reducen la cisteína y el ácido ascórbico. En cambio, son inactivos los hidruros de codehidrasa I y II. Su peso molecular importa 13.000 (264). Los narcóticos inhiben

la reducción del citocromo-c, pero no su oxidación, ocurriendo lo contrario con el CNH y el CO: la razón hay que buscarla en que los narcóticos inhiben a las deshidrogenasas y el ácido cianhídrico y el óxido de carbono a la citocromoxidasa.

Después de lo expuesto surge la cuestión de saber por qué algunos compuestos hemínicos son autooxidables y otros no; autooxidables son, en efecto, la citocromoxidasa y los citocromos *a*₁ y *b*, pero no el citocromo-c. Hasta el momento ninguna respuesta satisfactoria se ha dado a la pregunta, a pesar de que en esta cuestión hay interesados numerosos investigadores, y sólo soluciones parciales se ofrecen al problema. La contestación definitiva podrá lograrse cuando se conozca la estructura molecular de aquellos complejos, en particular la de las proteínas activantes, y su modo de unión al grupo prostético o *hemo*. Sin embargo, mucho se ha avanzado ya en este terreno.

El espectro de absorción demuestra que el citocromo-c tiene estructura de hemocromógeno; su forma reducida corresponde a un compuesto de *hemo* con una proteína; y su forma oxidada a una proteína-hematina. Ni el *hemo* ni la *heminina* son el *protohemo* o la *protohematina* de la hemoglobina y metahemoglobina, sino una modificación que resulta de colgar una molécula de cisteína en cada grupo *vinilo* del *protohemo* o de la *protohematina*. El grupo prostético del citocromo-c se une a la proteína por intermedio de las moléculas de cisteína, mediante enlaces thioetéreos que hacen la unión muy sólida (265). En la hemoglobina y en la metahemoglobina no existen ligazones de este género.

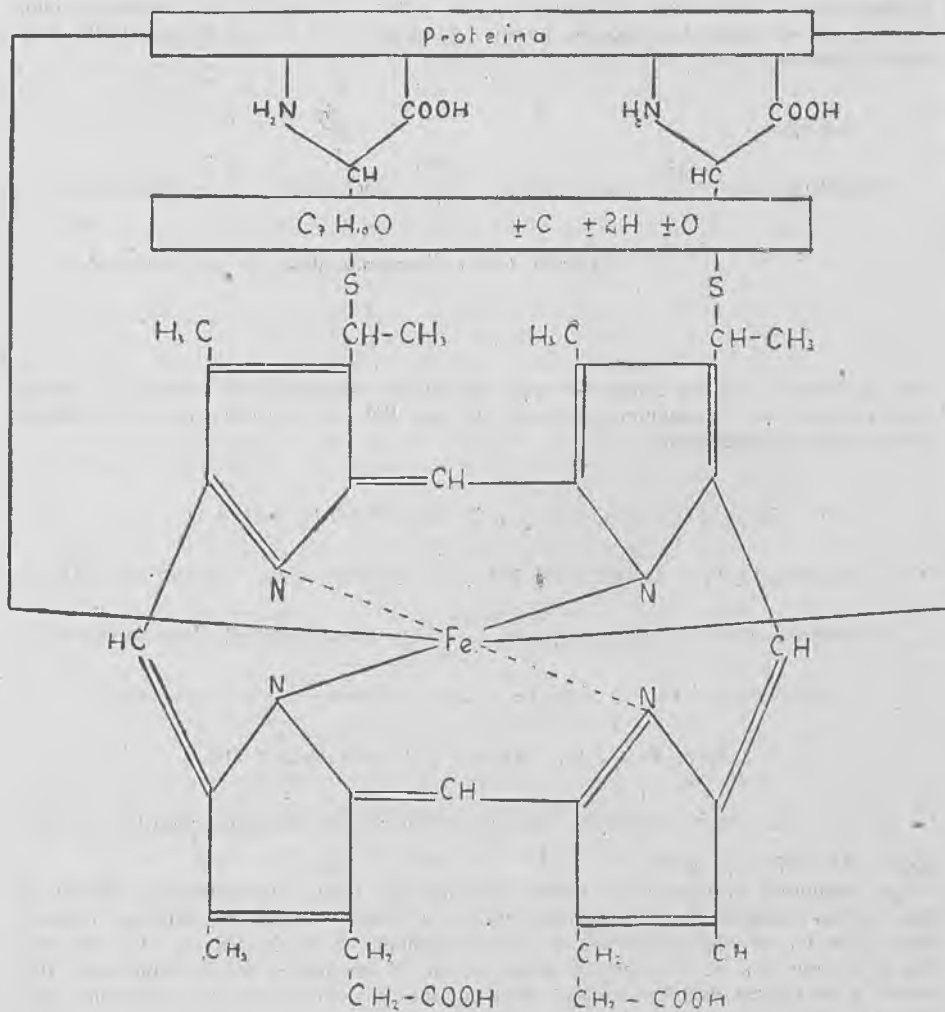
El carácter de hemocromógeno del citocromo lo determina un segundo enlace que se establece entre el átomo de hierro del grupo prostético y los grupos imidazólicos de la proteína. En la proximidad del átomo de hierro del citocromo y de la hemoglobina existen dos anillos imidazólicos. Ahora bien, en la hemoglobina, sólo uno de ellos se encuentra en posición favorable para que el átomo de nitrógeno se enlace coordinativamente con el átomo de hierro hemínico; en cambio, en el citocromo los dos anillos adoptan posiciones favorables para esta unión. Con ello resulta que en la hemoglobina queda libre una de las seis valencias coordinativas del átomo de hierro y puede adicionar oxígeno u óxido de carbono, mientras que en el citocromo-c, donde las seis valencias del hierro están ocupadas, aquellos gases no pueden combinarse. Con la referida disposición, el citocromo-c se comporta como un compuesto estable, ya que las seis valencias coordinativas del hierro las satura con los cuatro átomos de nitrógeno de los cuatro anillos pirrólicos, y con dos de los imidazólicos.

Así explica Theorell (266) y (267), que el citocromo-c no sea autooxidable, ni enlace oxígeno molecular, ni se combine con el CO o el CNH en el intervalo de los valores fisiológicos del pH. El hierro del citocromo queda *embutido* en la proteína, es decir, metido en una especie de *grieta* que ocupa el plano determinado por los nitrógenos de los anillos pirrólicos; sólo cuando el medio es fuertemente ácido o alcalino y los grupos imidazólicos se desprenden, pueden tener aquellos gases acceso a esta *grieta* y reaccionar con el hierro del grupo prostético. El esquema adjunto muestra la fórmula del citocromo-c con arreglo a las ideas de Zeile y Theorell que acaban de exponerse.

Theorell analizó la proteína que se une al grupo prostético en el citocromo-c (268). Comparando su composición con la proteína de la hemoglobina, resalta el alto contenido en lisina y la baja proporción de histidina que tiene la proteína del citocromo. Theorell comprobó que en cada mol. de citocromo sólo hay un grupo hemínico.

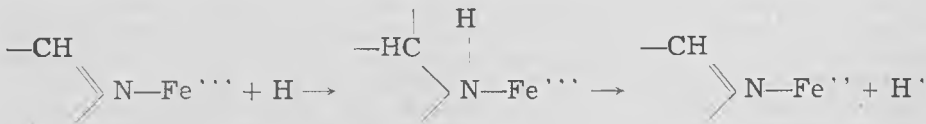
Cada uno de los citocromos *a*, *b* y *c* admite dos formas: la oxidada y la reducida; y como ambas se convierten una en otra reversiblemente, se comprende que cada tipo de citocromo constituya un sistema redox. Los potenciales de oxidación y reducción fueron determinados por numerosos investigadores (269), (270), (271), (272) y (273). Sus valores a pH = 7 son: citocromo *a* = 0,280 volt.; citocromo *b* = 0,040 volt.; citocromo *c* = 0,260 volt.

Se comprende que los citocromos puedan oxidar a numerosos substratos; por ejemplo, a la cisteína y al ácido ascórbico. Si no oxidan a otros de potencial más bajo, débese a la lentitud de la reacción, que hay que activar con determinadas deshidrogenasas. A causa de su potencial redox elevado, los citocromos activan el hidrógeno hasta separar su electrón y ionizarlo. Por eso, mejor que transportadores de hidrógeno son *transportadores de electrones*; sin embargo, pertenecen a los sistemas de oxidación y reducción de tipo perezoso.

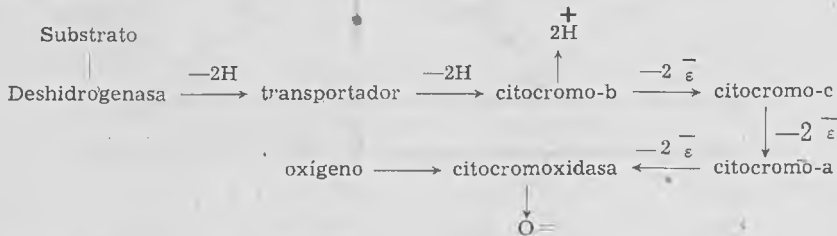


Citocromo c

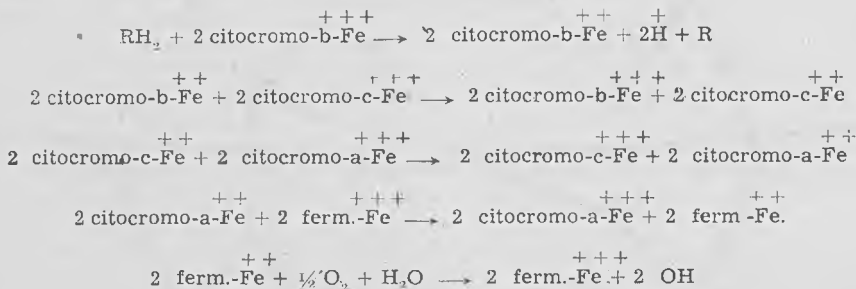
Para Zeile y Theorell (274) y (275), el mecanismo de la ionización se interpreta admitiendo que el hidrógeno activado por la deshidrogenasa y el transportador llega al citocromo y se fija a un átomo de nitrógeno imidazólico, del que seguidamente se suelta cediendo un electrón al hierro y ionizándose.



No puede asegurarse que los citocromos reaccionen con la citocromoxidasa individualmente o en cadena. Si reaccionan en cadena los valores del potencial redox indican que el orden de actuación de los citocromos *a*, *b* y *c* en el transporte electrónico debe ser:



y el mecanismo de las reacciones por las cuales se efectúa el transporte, podría representarse con el esquema siguiente, en que RH_2 es la forma leuco del último transportador de hidrógeno:



La suma de las cinco ecuaciones anteriores expresa la reacción definitiva de oxidación $2\text{H} + \text{OH} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$.

Los esquemas anteriores no tienen más que un valor representativo. Porque si bien se ha comprobado que el citocromo-b se oxida cuando se adiciona citocromo-c oxidado, no hay seguridad de que la cadena se establezca en el orden dicho, y de que sea el citocromo-b quien recoja el hidrógeno del transportador flavínico o de ciertas deshidrogenasas. Para algunos investigadores, el transporte electrónico comienza por el citocromo-b sólo en el caso en que el transportador anterior sea de tipo isoaloxacín-adenín-dinucleótido, como ocurre con la diaforasa. En otros casos, los fenómenos respiratorios se realizan exclusivamente a través del citocromo-c utilizándolo como primer transportador. Esta idea ha ganado considerable terreno después del descubrimiento de la citocromo-c-reductasa de Haas (276), y espera su confirmación a que se aisle el fermento de tejidos animales, pues por ahora sólo se ha encontrado en levaduras. Stotz cree que la misión de los citocromos *a* y *b* se reduce a sustituir a la citocromoxidasa, ya que el *b* y alguna forma del *a* son autooxidables.

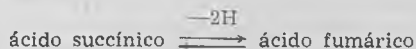
Actualmente, la escuela japonesa de Okunuki y Yakushiji, e investigadores de la solvencia de Barrón, estiman que los fermentos flavínicos de tipo aloxacín-ribosa-mononucleótido transfieren su hidrógeno al citocromo-c, mientras que los de tipo aloxacín-adenín-dinucleótido lo conducen primero al citocromo-b.

Sin duda ninguna, el modo y orden de actuación de los citocromos en los procesos respiratorios constituye todavía un problema sin solución definitiva, porque realmente falta un enlace entre las flavoproteínas y los citocromos. Que ese enlace pueda ser la diaforasa, en unos casos, y la citocromo-c-reductasa, en otros, no parece dudoso; sin embargo, hay que demostrar previamente que tales flavoproteínas se encuentran en los tejidos animales. También el sistema fumarato \rightleftharpoons succinato, en coordinación con la succínico-deshidrogenasa, puede servir de eslabón entre flavoproteínas y citocromos.

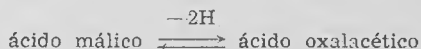
e) TRANSPORTADORES NO ENZIMATICOS

A este grupo se refieren algunos compuestos orgánicos susceptibles de aceptar y ceder hidrógeno con auxilio de deshidrogenasas y oxidasas convenientes. Tales son, entre otros, algunos ácidos bibásicos de cuatro átomos de carbono, ciertos ácidos cetónicos e hidroxiaácidos, las quinonas, el ácido ascórbico y algunos compuestos sulfurados.

a) *Ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos.*—El par ácido succínico-ácido fumárico transporta hidrógeno con arreglo a la reacción



que cataliza la succinodeshidrogenasa; y el par ácido málico-ácido oxalacético reacciona según el esquema



y se activa con la málicodeshidrogenasa. Ambos sistemas se mantienen en equilibrio gracias a una hidratasa, la *fumarasa*, que los enlaza conforme a la reacción ácido fumárico \rightleftharpoons ácido málico.

b) *Ácidos cetónicos.*—Krebs, Johnson y Elliot demostraron que el sistema lactato \rightleftharpoons piruvato puede obrar de transportador de hidrógeno entre un sistema que reduzca al piruvato y otro que oxide al lactato. Así sucede en la dismutación anaerobia de piruvato por la pirúvico-deshidrogenasa en tejidos y bacterias; una molécula de piruvato se oxida a acetato y CO₂, y otra se reduce a ácido láctico. El lactato puede oxidarse a piruvato y el ciclo se repite. De esta forma, el piruvato transporta hidrógeno para su propia oxidación.

Como transportadores obran también los ácido acetoacético y β -hidroxibutírico en presencia de la β -hidroxibutírico-deshidrogenasa.



La desaminación oxidativa del ácido glutámico con la glutámico-deshidrogenasa constituye un mecanismo catalítico de transporte de hidrógeno, ya que el aminoáci-

do se regenera en la transaminación del ácido α -cetoglutarico con alanina o ácido aspártico, en presencia de aminotransferasas.

c) *Quinonas y polifenoles.*—Son excelentes medios para transferir hidrógeno en el reino vegetal; las quinonas se convierten así en difenoles, y la reacción la cataliza una polifenoloxidasas o un sistema complejo constituido por polifenol-oxidasas, peroxidasas y determinados colorantes del grupo de las flavanonas. El potencial redox de la o-quinona \rightleftharpoons pirocatequina importa $E'_0 = 0,430$ volt.

d) *Acidos ascórbico y dehidroascórbico.*—En procesos de oxidación reversible, la vitamina C o ácido ascórbico pasa a ácido dehidroascórbico, en presencia de ascórbico-oxidasas y un donador de hidrógeno; de donde resulta, que en las condiciones indicadas, aquellos ácidos se comportan como transportadores de hidrógeno. La oxidación reversible tiene lugar a $pH = 5,5$, y el potencial redox del sistema es $E'_0 = 0,166$ volt. a $pH = 4$.

e) *Compuestos sulfurados.*—Entre los transportadores de este grupo figura el glutathión como el de mayor interés. Su forma reducida suele representarse por $G-SH$, y la oxidada, por $G-S-S-G$. El paso de una a otra forma lo determinan las condiciones del medio. El glutathión reducido sólo es estable en medio ligeramente ácido, y el oxidado, en medio débilmente alcalino. Por eso, la reacción es reversible. Hállase en casi todos los tejidos del reino vegetal y animal, la mayor parte en su forma reducida $G-SH$.

Cataliza la oxidación de los ácidos grasos no saturados, y de las proteínas con grupos SH . Lo oxida el ácido dehidroascórbico, pero no el sistema citocromo-citocromoxidasas. Activa la acción de la glioxalasa, de la que es cofermento. No se ha podido intercalar como transportador en ninguna de las cadenas de oxidación. Sin embargo, regula los fenómenos de oxidación y reducción y mantiene activos los sistemas enzimáticos que contienen grupos $-SH$, libres. Por esto, adiciones de glutathión favorecen la glucólisis, la oxidación de piruvato y la síntesis de hidratos de carbono. Ameer y Elvehjem sugieren que el glutathión sirve de coenzima a alguna deshidrogenasa en la oxidación tisular a través del sistema citocromico.

TERCERA PARTE

ASPECTOS DINAMICOS DE LA OXIDACION Y REDUCCION BIOLÓGICAS

TIPOS DE SISTEMAS OXIDATIVOS

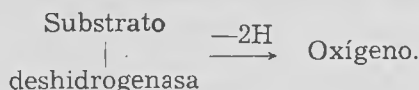
Los fermentos de la oxidación y reducción, oxidasas y deshidrogenasas, en conexión entre sí por medio de los transportadores, llevan a cabo la oxidación de los materiales orgánicos mediante variados mecanismos. Sobre todo, disponen de numerosos itinerarios para conducir el hidrógeno del substrato a su aceptor final, sea éste un metabolito o el oxígeno molecular. Unas veces, las menos, el hidrógeno pasa del substrato al oxígeno directamente o a través del citocromo; y otras, las más, es conducido a él por medio de transportadores de tipo nicotínico o flavínico, o cabalgando sobre moléculas de naturaleza no enzimática. Circunstancias y factores diversos determinan en cada caso el medio más cómodo, rápido y seguro para que la transferencia se efectúe, o el más adecuado, aunque sea largo, para que la oxidación se cumpla de modo que las manifestaciones energéticas alcancen los valores que convienen en el instante. El organismo tiene abiertos numerosos caminos para cumplir sus fines, y en cada momento usa el que más se acomoda a sus necesidades.

Si el complejo enzimático consta únicamente de proteína activante y un sistema de oxidación y reducción, éste suele ser electroactivo y autooxidable, y transfiere los electrones directamente al oxígeno molecular. Si lo forman dos transportadores, el uno pertenece al tipo perezoso y el otro al electroactivo. Si la oxidación se realiza interviniendo varios sistemas óxido-reductores, se suceden alternativamente uno perezoso y otro electroactivo, hasta que los electrones alcancen el oxígeno molecular.

El 80 % o más del oxígeno que se consume en la respiración celular de los tejidos animales oxida las materias orgánicas a través de la citocromoxidasa, y el resto lo hace directamente, o quizás a través del citocromo-b tan sólo, pues por su ligera autoxidabilidad puede obrar desconectado con el fermento de Warburg.

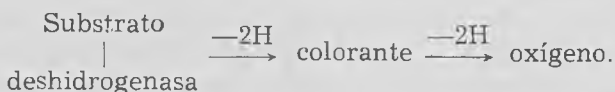
Entre los sistemas oxidativos que el organismo vivo utiliza, merecen especial mención los que a continuación se indican, escalonados en el orden creciente de su complejidad, y probablemente de su interés.

TIPO I.—Consta de substrato, una deshidrogenasa específica, que lo activa, y oxígeno, como aceptor directo de hidrógeno. El esquema representativo es como sigue:



En la oxidación se produce agua oxigenada, que las catalasas y peroxidases descomponen seguidamente. Así actúa la xantinodeshidrogenasa sobre la xantina e hipoxantina en células desprovistas de fermentos hemínicos.

TIPO II.—Algunas deshidrogenasas no reducen directamente al oxígeno molecular, pero sí a un colorante, por ejemplo, al azul de metileno; en este caso, el oxígeno oxida a la forma *leuco*, y el colorante actúa de transportador de hidrógeno. El sistema oxidativo se representa así:



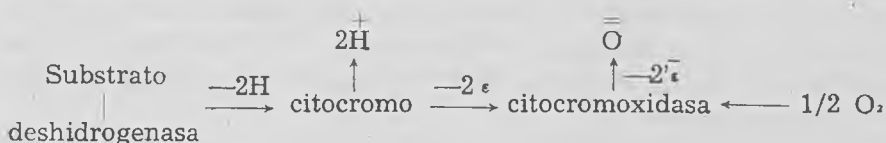
También aquí se produce peróxido de hidrógeno, como en el tipo I. Por este mecanismo, la succinodeshidrogenasa quema ácido succínico en presencia de azul de metileno. No interesa más que para realizar oxidaciones *in vitro*.

TIPO III.—A veces, entre el substrato activado por la deshidrogenasa y el oxígeno molecular se interponen dos transportadores: uno de tipo perezoso, la coenzima I o la II, que acepta el hidrógeno arrancado al substrato, y otro electroactivo, de naturaleza flavínica, que lo conduce después hasta el oxígeno molecular, conforme al esquema.



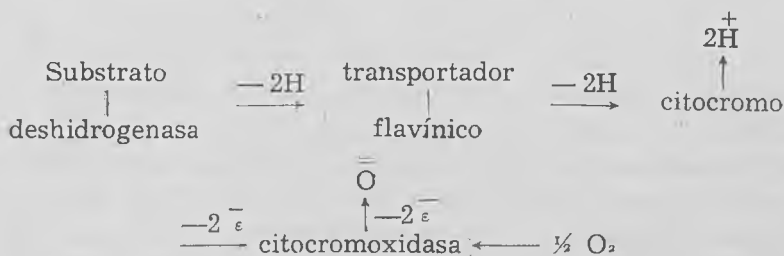
La oxidación del fermento amarillo en su forma reducida sólo se logra a presiones elevadas, lo que resta interés fisiológico a este sistema oxidativo. A él se refiere el sistema de Warburg de las células desprovistas de ferroporfirina, en las que la hexosa-6-fosfato se oxida con codéhidrasa II y fermento amarillo. En la reacción se produce agua oxigenada.

TIPO IV.—Cuando interviene el citocromo como transportador, no se separa peróxido de hidrógeno, sino agua, en virtud de la reacción iónica $\overset{+}{\text{H}} + \overline{\text{OH}} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$. Estos sistemas constan, por lo menos, de un sistema perezoso y otro electroactivo. El más sencillo sería



De esta manera, la succinodeshidrogenasa oxida el ácido succínico a ácido fumárico. Desempeña papel importante en el organismo, puesto que constituye el último eslabón del ciclo de Szent-Györgyi. Es característico de microorganismos aerobios.

TIPO V.—Resulta de combinar los tipos I y IV, y corresponde al modo de acción de las deshidrogenasas con cofermento flavínico; por ejemplo, la xantinodeshidrogenasa cuando el transporte se efectúa a través del citocromo. El esquema es como sigue:



Se compone de dos sistemas electroactivos entre los que se intercala uno perezoso, el citocromo. Se ignora el orden en que los citocromos toman parte en el transporte.

TIPO VI.—Cuando la deshidrogenasa requiere coenzima I ó II y la oxidación se efectúa a través del sistema citocrómico, precisa interponer entre los dos sistemas perezosos un transportador electroactivo de núcleo aloxacínico: la diaforasa, la citocromo-c-reductasa u otros. El esquema de la reacción es:

EL CICLO DE SZENT-GYÖRGYI

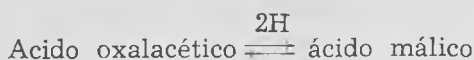
En 1909-1910, Thunberg (173), Battelli y Stern, comprobaron que cuando se añade ácido succínico a suspensiones de tejidos animales triturados, aumenta el consumo de oxígeno en proporciones superiores a las que son necesarias para oxidar el ácido. Experimentos análogos de Szent-Györgyi, llevados a cabo en 1934-1937, previa adición de alguno de los ácidos oxalacético, málico, fumárico y succínico, condujeron al mismo resultado. Szent-Györgyi pudo comprobar, además, que por cada molécula de oxígeno que el músculo consume, otra de anhídrido carbónico se desprende, lo que demuestra que el material oxidado es el glucógeno. A consecuencia de éstos descubrimientos admitióse que el ácido succínico actuaba de catalizador de la respiración.

Por la misma época habíase observado que el sistema citocrómico acepta directamente hidrógeno de la succinodeshidrogenasa, pero no de las deshidrogenasas que actúan con cofermento nicotínico; se sabía que la casi totalidad de oxígeno que toma parte en la respiración celular, lo hace a través del sistema citocromo-citocromoxidasa. Impresionado por estos hechos, Szent-Györgyi creyó que la oxidación debía realizarse a través del ácido succínico, y trató de interpretarla estableciendo el ciclo que lleva su nombre.

Los experimentos decisivos en que se basa el ciclo del investigador húngaro hiciéronse, en un principio, con músculo pectoral de paloma, pero los resultados fueron comprobados después con hígado y riñón de diversos animales, y aun con animales vivos (277) y (278). Compruébase así que la intensidad respiratoria de los tejidos crece cuando a suspensiones de ellos en disoluciones de fosfato se añade un poco de ácido fumárico, y disminuye si se agregan pequeñas cantidades de ácido malónico; en este caso, la actividad respiratoria se restablece al añadir seguidamente trazas del primer ácido (279). Por entonces, también, se averiguó que el ácido malónico inhibe la acción de la succinodeshidrogenasa (280); y se comprobó que la reducción de los citocromos, en suspensiones del citado músculo, se acelera en presencia de un poco de succinato, fumarato, malato u oxalacetato, pero no de lactato o α -glicerofosfato (281).

Por lo expuesto. Szent-Györgyi y colaboradores (272) llegaron a la conclusión de que, en la respiración celular, los cuatro ácidos dicarbo-

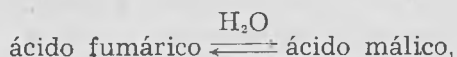
xílicos citados intervienen como transportadores de hidrógeno, distribuidos en dos sistemas: uno el ácido oxalacético-ácido málico, cuya transformación se cataliza con la málico-deshidrogenasa,



y otro el ácido fumárico-ácido succínico, cuya transformación se activa por la succinodeshidrogenasa



El primer sistema recibe hidrógeno del substrato a través de coenzima I, con lo que el ácido oxalacético pasa a ácido málico (283); y el segundo cede hidrógeno al sistema citocrómico a través de la succinodeshidrogenasa, que convierte el ácido succínico en fumárico. La transferencia de hidrógeno del ácido málico al ácido fumárico, para regenerar los ácidos oxalacético y succínico y evitar solución de continuidad en el transporte, la efectúa un fermento flavínico (284), que, según Banga (285) y Laki* (286), es el fermento amarillo, y según Fischer y Eysenbach, la fumarato-hidrogenasa (287). Un fermento hidratante, la *fumarasa*, que se encuentra en casi todos los tejidos vegetales y animales, cataliza la reacción

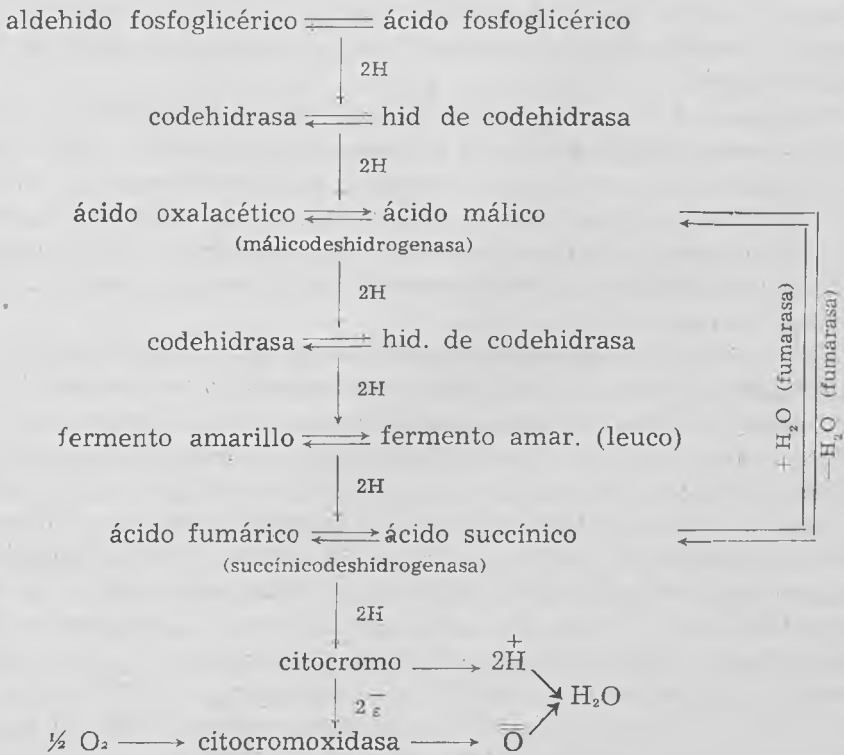


y mantiene un equilibrio entre los dos pares de ácidos dicarboxílicos C₄, en el que hay 25 % de ácido fumárico y 75 % de ácido málico (288).

Szent-Györgyi expuso en 1937 el ciclo de su nombre (289) y lo sintetizó en el esquema que se indica a continuación. En este proceso, la triosofosfatodeshidrogenasa arranca hidrógeno al aldehído fosfoglicérico y lo fija su coenzima, la codehidrogenasa I, que pasa a hidruro de codehidrasa. Seguidamente, el hidruro de coenzima I reduce el ácido oxalacético a ácido málico; después, la málicodeshidrogenasa arranca hidrógeno al ácido málico y por intermedio de su coenzima I lo transfiere al fermento amarillo; de este modo se regenera el ácido oxalacético y el sistema queda en condiciones de recibir y transportar nuevas cantidades de hidrógeno del substrato. A continuación, el fermento amarillo, en su forma *leuco*, transfiere hidrógeno al ácido fumárico y lo reduce a ácido succínico, regenerándose la forma oxida-

da de la flavienzima. Finalmente, la succinodeshidrogenasa, por sí, o por intermedio del *factor-SC*, cede al citocromo los dos átomos de hidrógeno recibidos y el fermento hemínico los oxida, separando dos iones $\overset{+}{\text{H}}$ y transfiriendo $2\overset{-}{\epsilon}$, primero a la citocromoxidasa y, después, al oxígeno. Por este mecanismo cada dos átomos de hidrógeno se oxidan con uno de oxígeno y separan una molécula de agua.

CICLO DE SZENT-GYÖRGYI



El ciclo de Szent-Györgyi está de acuerdo con los resultados experimentales que se obtienen en el estudio de la actividad respiratoria de suspensiones de músculo pectoral de paloma. En efecto, a juicio del referido investigador, las deshidrogenasas actúan en las superficies internas de la trama celular, en las que se hallan fuertemente adsorbidas tanto ellas como los ácidos bibásicos C_4 que intervienen en el ciclo. La inhibición respiratoria que provoca el ácido malónico encuentra

su origen en la competencia que se establece entre él y el ácido succínico por ocupar la superficie de los gránulos; esta competencia se debe a la semejanza de estructura de ambos cuerpos, y trae como resultado la inhibición respiratoria de la célula, a medida que el malonato desplaza al succinato; porque el ácido malónico es incapaz de transportar o ceder hidrógeno a la succinodeshidrogenasa, y ésta, en consecuencia, se paraliza.

Por otra parte, teniendo en cuenta que el ácido fumárico goza de mayor afinidad para la enzima que el malónico, no es de extrañar que al agregar fumarato, el malonato se desplace y la respiración celular recobre su ritmo normal, aun en presencia de ácido malónico. Ahora bien, a medida que el fumarato se reduce a succinato, el ácido malónico lo desaloja de los gránulos y la actividad respiratoria se atenúa de nuevo.

El ciclo es correcto desde el punto de vista termodinámico, puesto que los potenciales redox de los componentes del sistema (véase tabla de la página 20) crecen en el orden en que intervienen en él. Por esto, la hidrocoenzima I reduce al oxalacetato, el malato al fumarato y el succinato al sistema citocrómico, a condición de que se encuentren en presencia de las deshidrogenasas que catalizan las correspondientes reacciones.

Contra la interpretación de Szent-Györgyi se han formulado numerosas y serias objeciones. Ball (290) estima superfluo la intervención del par oxalacetato-malato, desde el momento en que el fermento amarillo u otra enzima flavínica oxidan directamente al hidruro de coenzima. Quizás la objeción no quepa si la intervención de aquellos dos ácidos se lleva a cabo al estado de ésteres fosfóricos, como cree Lipmann (291), en opinión del cual la oxidación de malato y fosfato inorgánico produce fosfoenoloxalacetato, de gran contenido energético y de mucho interés en la síntesis de ácido fosfopirúvico. A pesar de la objeción de Ball, el ciclo de los cuatro ácido dicarboxílicos C, puede mantenerse, aun cuando el oxalacetato no se regenere por oxidación de malato, ya que el ácido oxalacético se produce continuamente en la carboxilación de piruvato con dióxido de carbono (292).

Stare y Baumann creen poco probable que el viejo fermento amarillo actúe como transportador entre el sistema oxalacetato-malato y el par succinato-fumarato, puesto que dicho fermento no se ha aislado más que de levaduras. Pudiera ser que el transporte lo efectúe la diaforasa, que según Euler y colaboradores es un transportador flavínico más adecuado; o la fumarato-hidrogenasa, aunque tampoco se tiene noticia cierta de que exista en tejidos animales, a menos que se identifique con la succinodeshidrogenasa (293). Algunos investigadores, en-

tre ellos Green (294), opinan que no hacen falta fermentos flavínicos para enlazar los dos pares de ácidos dicarboxílicos, pues, a su juicio, el sistema fumarato-succinodeshidrogenasa tiene capacidad para oxidar directamente al hidruro de codehidrogenasa I. Ahora bien, si esto es así, ¿qué papel resta al par oxalacético-málico después de la acerba crítica de Ball?

No constituye, en cambio, objeción grave el hecho de que el ácido succínico participe en la composición del organismo en débiles proporciones; en primer término, porque su papel es catalítico, y, en segundo lugar, porque cualquiera de los otros tres ácidos C₄ lo reemplazan; y ya se indicó que el ácido oxalacético se forma directamente por carboxilación de ácido pirúvico con la β -carboxilasa.

La intervención de los ácidos dicarboxílicos en la respiración celular ha perdido algún interés desde el momento en que Haas, Horecker y Hogness descubrieron en las levaduras las citocromo-c-reductasas I y II. Estos fermentos de tipo aloxacín-mononucleótido transfieren directamente hidrógeno desde las coenzimas I ó II al citocromo-c. El día en que se pruebe que la citocromo-c-reductasa se halla presente en los tejidos animales, la respiración celular podrá explicarse sin necesidad del ciclo de Szent-Györgyi. Ya es interesante que Potter haya logrado la oxidación de trisafosfato en un medio al que previamente se había agregado la suficiente cantidad de malonato para inhibir totalmente a la succinodeshidrogenasa (295), lo que prueba que la oxidación se realizó por vía diferente a la del ciclo que discutimos.

El investigador húngaro no cree que todos los metabolitos hayan de oxidarse a través de los ácidos dicarboxílicos (296). A su juicio, algunos pueden reducir fumarato a succinato directamente, esto es, sin la intervención del par oxalacetato-malato, Así debe suceder con el sistema lactato-piruvato, cuyo potencial redox es próximo al del sistema oxalacetato-malato, y en el que no cabe esperar que el lactato reduzca al oxalacetato. A pesar de todas las objeciones formuladas, el ciclo de Szent-Györgyi subsiste como *artefacto* necesario para explicar la oxidación de las materias orgánicas.

METABOLISMO OXIDATIVO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

El metabolismo de los polisacáridos comienza, generalmente, con una fase anaerobia, en la que el almidón o el glucógeno se desintegran en moléculas más sencillas hasta separar piruvato. Alcanzado este punto, la demolición del piruvato puede continuar en anaerobiosis,

dando lugar a ácido láctico o a alcohol, o proseguir con una desintegración oxidativa que origina agua y gas carbónico.

El ácido pirúvico ocupa un punto crucial entre la fase glucolítica o de fermentación de los carbohidratos y la fase posterior de oxidación aerobia, con la nota curiosa de que se origina siguiendo un itinerario único. El es producto forzoso en la demolición de los polisacáridos y de todas aquellas sustancias que pasan por la forma hexosa-6-fosfato. Hidratos de carbono, grasas y proteínas dan lugar a piruvato en sus reacciones de metabolismo. La desintegración del ácido pirúvico se desliza por uno de estos dos caminos: a) el de la anaerobiosis, que conduce a la formación de ácido láctico o de alcohol; b) el de la aerobiosis, a lo largo del cual el piruvato se quema totalmente hasta separar agua y gas carbónico.

Proyectamos dedicar atención especial a la demolición aerobia del piruvato; pero con el fin de dar unidad a nuestro trabajo, creemos conveniente reseñar antes, aunque sólo sea a grandes rasgos, la fase de desintegración anaerobia de carbohidratos a piruvato y la destrucción anaeróbica de este compuesto.

DESINTEGRACION ANAEROBIA DE CARBOHIDRATOS A PIRUVATO

Creíase hasta hace poco que la demolición oxidativa de los polisacáridos, al igual que su desintegración digestiva, comenzaba por una hidrólisis de los enlaces glucosídicos, en que los iones $\overset{+}{\text{H}}$ y $\overline{\text{OH}}$ del agua convierten el almidón o el glucógeno en glucosa. Después de los trabajos de Parnas (297), la escisión del enlace glucosídico se atribuye al ácido fosfórico, cuyos iones $\overset{+}{\text{H}}$ y $\overline{\text{PO}_4\text{H}_2}$ desempeñan un papel análogo al que los iones $\overset{+}{\text{H}}$ y $\overline{\text{OH}}$ del agua ejercen en la hidrólisis. Ahora bien, mientras la descomposición hidrolítica del almidón o glucógeno da lugar a moléculas de glucosa, la *fosforolisis* o escisión provocada por los fosfatos produce el *éster de los Cori* o glucosa-1-fosfato.



(Ester de los Cori.)

La reacción la cataliza una enzima, la *fosforilasa*, que se encuentra allí donde los polisacáridos hayan de ser *desmolizados* oxidativamente, lo mismo en animales que en plantas. El fermento no actúa más que en presencia de fosfatos inorgánicos y la reacción es reversible, lo que significa que la fosforilasa sintetiza el glucógeno o almidón a partir del éster de los Cori (298) y (299). En el equilibrio hay 23 % de éster Cori, a $\text{pH} = 7$.

La fosforólisis y la transfosforilación constituyen los itinerarios a seguir por los hidratos de carbono para su desintegración oxidativa en tejidos animales superiores (300). Quizás en la fase embrionaria los animales dispongan de otros mecanismos de demolición oxidativa de carbohidratos en los que la fosforilación no desempeñe papel alguno (301), y aún parece probable que esto mismo acontezca en algunos hongos, levaduras y bacterias. En todo caso, la fosforilación significa un progreso en el metabolismo de polisacáridos, pues las fermentaciones que se realizan sin su auxilio son obra exclusiva de organismos inferiores o de tejidos rudimentarios, y transcurren con menores rendimientos energéticos.

El cuadro adjunto indica las reacciones que tienen lugar en la desintegración anaeróbica del almidón o glucógeno hasta separar ácido pirúvico. El orden en que aquéllas figuran en él es el orden en que se suceden en el proceso; todas son reversibles, y, como puede observarse, la molécula de fosfato interviene en las reacciones intermedias, pero está ausente del estado inicial, glucógeno, y del final, piruvato.

La reacción número 2 la cataliza la *fosfoglucomutasa* en presencia de iones Mg^{++} . Se trata de una reacción reversible, en cuyo equilibrio hay 5 % de éster Cori y 95 % de éster *Robinson* (302).

La conversión de glucosa-6-fosfato, o éster *Robinson*, en fructosa-6-fosfato, o éster *de Neuberg* (reacción número 3), tiene lugar por la acción de una enzima presente en el músculo y en las levaduras: la *fosfohexoisomerasa* u *oxoisomerasa*. En el equilibrio hay presentes 30 % de fructosa-6-fosfato y 70 % de glucosa-6-fosfato. La mezcla suele denominarse *lactacidógeno* o éster *de Embden*.

La reacción número 4 es una transfosforilación que lleva a cabo la *fosfohexoquinasa* en presencia de adenosinatrifosfato o ATP; ella en sí es irreversible, pero la fructosa-1-6 difosfato, o éster *Harden-Young*, regenera el éster de Neuberg por la acción de las fosfatasas.

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN SU FASE ANAEROBICA

NUM.	FERMENTO.	REACCION
1	Fosforilasa	Glucógeno + PO ₄ H ₃ ⇌ glucosa-1-fosfato.
2	Fosfoglucomutasa	Glucosa-1-fosfato ⇌ glucosa-6-fosfato.
3	Fosfohexoisomerasa	Glucosa-6-fosfato ⇌ fructosa-6-fosfato.
4	Fosfohexoquinasa	Fructosa-1-6-difosfato ⇌ dioxiacetona-fosfato + ADP.
5	Zimohexasa o aldolasa	Fructosa-1-6-difosfato ⇌ dioxiacetona fosfato + aldehido-3-fosfoglicérico.
6	Fosfogliceroisomerasa	Dioxiacetona fosfato ⇌ aldehido-3-fosfoglicérico.
7	Reacción no enzimática	Aldehido-3-fosfoglicérico + PO ₄ H ₃ ⇌ aldehido-1-3-difosfoglicérico.
8	Triosa fosfatodeshidrogenasa	Aldehido-1-3-difosfoglicérico + Co I ⇌ ác.-1-3-difosfoglicérico + Co I-H ₂ .
9	Fosfoquinasa innominada	Ac. 1-3-difosfoglicérico + ADP ⇌ ácido 3-fosfoglicérico + ATP.
10	Fosfogliceromutasa	Ac. 3-fosfoglicérico ⇌ ác.-2-fosfoglicérico.
11	Enolasa	Ac. 2-fosfoglicérico—H ₂ O ⇌ ác.-2-fosfoenolpirúvico.
12	Fosfopiruvatotransfosforilasa	Ac. 2-fosfoenolpirúvico + ADP ⇌ ácido pirúvico + ATP.

Nótese que las reacciones números 3 y siguientes son comunes a la demolición del glucógeno o almidón y a la desintegración de hexosas, pues la glucosa-6-fosfato, lo mismo se produce en la isomerización del éster Cori con la fosfoglucomutasa que en la fosforilación de la hexosa con ATP en presencia de hexoquinasa; y como quiera que la hexosa-6-fosfato regenera hexosa por la acción de fosfatasas, el paso de almidón o glucógeno a glucosa constituye un proceso reversible que se efectúa con arreglo al siguiente esquema:



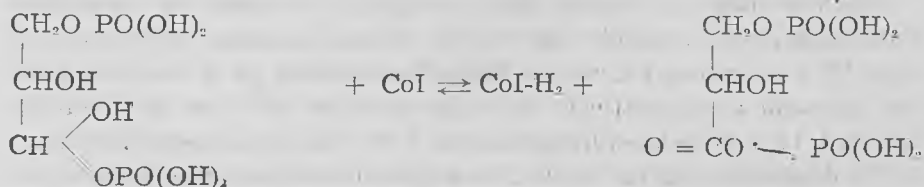
Tan pronto se forma fructosa-1-6-difosfato, un fermento desmólitico, la *zimohexasa* o *aldolasa*, que se encuentra en todas las células, desdobla la cadena de seis carbonos en dos triosa-fosfatos (reacción número 5), provocando la acción enzimática de mayor trascendencia en el metabolismo de glúcidos (303). La reacción es reversible.

La reacción número 6 constituye un fenómeno de isomerización entre dioxiacetona-fosfato y aldehido-3-fosfoglicérico; la cataliza la *isomerasa* o *fosfogliceroisomerasa* en una reacción reversible en cuyo equilibrio hay 3 % de aldehido-3-fosfoglicérico y 97 % de dioxiacetona fosfato (304) y (305).

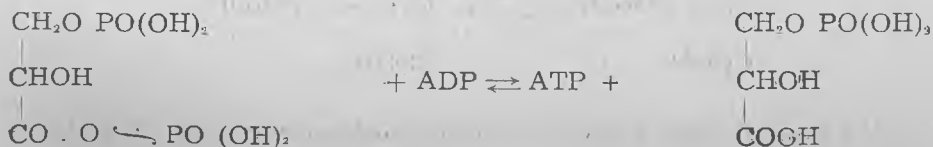
La conversión del aldehido-3-fosfoglicérico o *éster de Fischer*

en ácido-3-fosfoglicérico o *éster de Nilsson*, constituye la esencia de las reacciones números 7, 8 y 9. Antes se interpretaba como una óxido-reducción acoplada en que durante los primeros momentos la triosafosfatodeshidrogenasa dismuta al aldehído-3-fosfoglicérico en ácido-3-fosfoglicérico y ácido α -glicerofosfórico. En cambio, hoy, después del descubrimiento del ácido-1-3-difosfoglicérico (306), se supone que una triosafosfato-deshidrogenasa, la *aldehído-1-3-difosfoglicérico-deshidrogenasa* oxida el aldehído-3-fosfoglicérico a ácido-1-3-difosfoglicérico en presencia de fosfatos inorgánicos. No se sabe si se forma primero el aldehído-1-3-difosfoglicérico, mediante fosforilación del aldehído-3-fosfoglicérico (reacción núm. 7), y es éste el que por la triosafosfatodeshidrogenasa pasa a ácido-1-3-difosfoglicérico (reacción número 8); o si la deshidrogenación la efectúa la triosafosfato-deshidrogenasa adsorbiendo una molécula de fosfato inorgánico y otra de aldehído-3-fosfoglicérico y arrancando simultáneamente un hidrógeno a cada una de dichas moléculas (307). La segunda hipótesis concuerda mejor con el hecho de que el aldehído-1-3-difosfoglicérico no se haya aislado hasta la fecha, y parece ser que de día en día gana más terreno.

Warburg y Christian creen que la reacción número 7, es decir, la formación de aldehído-1-3-difosfoglicérico no tiene carácter enzimático; en cambio, Meyerhof (308) opina que el fenómeno exige la presencia de una *fosfoquinasa* desconocida todavía; en todo caso, al oxidarse el aldehído-1-3-difosfoglicérico en ácido-1-3-difosfoglicérico prodúcese un cambio en la estructura interna de la molécula, del que nace un enlace fosfático de alto contenido energético, el que hay en el grupo carbonilo.



Seguidamente, el ácido 1-3-difosfoglicérico cede una mol. de $\text{PO}_4 \text{H}_3$ a la ADP y a la vez se produce la reacción número 9, a la que cataliza una transfosforilasa o fosfoquinasa innominada. La reacción es la siguiente:

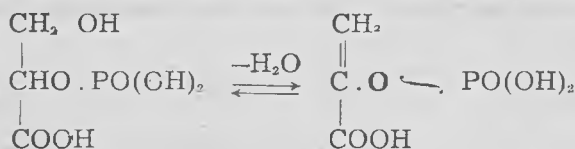


y su interés estriba en que mediante ella la ATP almacena 11.500 calorías de energía libre procedentes del substrato y retenidas por el enlace fosfático del grupo carboxilo. Bucher (309) y Kubowitz (310) han aislado el fermento fosforilante a partir de levadura y de músculo humano, respectivamente. La reacción número 9 desplaza el equilibrio de la reacción número 8 hacia la derecha y facilita la oxidación del aldehído-1-3-difosfoglicérico.

La reacción número 8 ofrece excepcional interés. El hidruro de co-dehidrasa I que se produce en los primeros momentos, mediante deshidrogenación del aldehído-1-3-difosfoglicérico con la triosafosfatodeshidrogenasa, reduce el aldehído-3-fosfoglicérico a ácido α -glicerofosfórico en un fenómeno de dismutación aparente; y se dice aparente, porque, en realidad, no se trata de una dismutación, sino de una óxido-reducción acoplada, en que el hidruro de coenzima I se desprende de la triosafosfatodeshidrogenasa y se une a la α -glicerofosfato-deshidrogenasa, con la que lleva a cabo la hidrogenación de una molécula de aldehído-3-fosfoglicérico. Es más, en contra de la opinión generalmente inserta en los libros, parece probable que sea el dioxiacetonafosfato y no el aldehído-3-fosfoglicérico quien oxide al hidruro de codehidrogenasa I, pues el ácido α -glicerofosfórico que se forma posee la configuración de ácido-(1)- α -glicerofosfórico. Si procediera de la reducción del aldehído-3-fosfoglicérico, tendría la configuración (d)- de éste y del ácido (d)-3-fosfoglicérico.

La reacción número 10 la acelera la *fosfogliceromutasa* de tejidos animales y levaduras; el equilibrio de la misma se halla fuertemente desplazado hacia el lado del ácido-3-fosfoglicérico (311), (312) y (313).

Una *hidratasa*, la *enolasa*, que se encuentra en todos los organismos vivos capaces de consumir hidratos de carbono, cataliza la reacción número 11, y en asociación con la *fosfogliceromutasa* de la reacción anterior, da lugar a un equilibrio en el que subsisten 58 % de ácido-3-fosfoglicérico, 12 % de ácido-2-fosfoglicérico y 30 % de ácido fosfoenol-pirúvico. La deshidratación del ácido 2-fosfoglicérico es muy interesante, porque a consecuencia de ella se origina un enlace fosfático de alto valor energético.



A causa de este enlace, el ácido-2-fosfopirúvico cede con facili-

dad su radical fosfórico a la ADP y le transfiere íntegramente las 10.000 calorías de energía libre que la ligazón fosfática había represado del sustrato.

Con ello tiene lugar la reacción número 12, en que por transfosforilación, el ácido fosfopirúvico pasa a ácido pirúvico y la ADP se convierte en ATP,



La reacción la cataliza una transfosforilasa, la fosfoenol-pirúvico-transfosforilasa, en presencia de iones Mg^{++} o K^+ (314) y (315). Se creyó que éste fuera el único proceso irreversible de todos los que tienen lugar en la demolición anaerobia del glucógeno, pero Lardy y Ziegler (316) han demostrado recientemente con el isótopo P_{32} , que se trata de una reacción reversible muy desplazada hacia la formación de ácido-2-fosfopirúvico. La fosforilación del ácido pirúvico se favorece con la presencia de oxígeno. El ácido fosfopirúvico se produce también por descomposición del ácido fosfo-enol-oxalacético (317). Ambas reacciones intervienen en la síntesis del glucógeno y en la interpretación del efecto Pasteur-Meyerhof.

Con la reacción número 12, el metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono aboca en la separación del ácido pirúvico. Ninguna otra sustancia de las que se producen en la degradación oxidativa de hidratos de carbono posee la reactividad de aquel compuesto; y ninguna es capaz de tomar parte en tan variado número de reacciones. Unas en medio aerobio, otras en anaerobiosis, casi todas requieren difosfotiamina como cofermento. Por eso, cuando hay deficiencia de vitamina B_1 , el ácido pirúvico se acumula en sangre y otros tejidos, y origina estados patológicos, particularmente síntomas de beri-beri.

El ácido pirúvico es producto de oxidación de las triosas, y la sustancia madre del ácido láctico y alcohol en las fermentaciones que llevan sus nombres. En presencia de oxígeno puede ser activado por la proteína correspondiente y oxidado a ácido acético y gas carbónico. En ausencia de él, y por efecto de una óxido-reducción intramolecular, se desdobra en ácido-acético y ácido-fórmico; o se reduce a ácido láctico mediante la acción de la pirúvico-deshidrogenasa, por cuanto sufre una dismutación y se convierte en acetato y lactato. En los organismos superiores, el ácido pirúvico fija CO_2 y se transforma en oxalacetato, iniciando un itinerario que simplifica su oxidación; o puede reaccionar con ácido glutámico para dar origen a alanina. Surge como producto de desaminación directa o indirecta de algunos aminoácidos, por lo

que sirve de enlace entre proteínas y carbohidratos, y aun de hidratos de carbono y grasas, ya que su producto de descomposición, el ácido acético, es manantial en potencia de los ácidos grasos. Sin duda alguna, el ácido pirúvico ocupa una posición excepcional en la cadena de reacciones que conducen a la desintegración oxidativa de los carbohidratos; su puesto se halla en la bifurcación de los itinerarios fermentativos y oxidativos. Como aduanero celoso, él determinará por qué camino ha de conducirse aquella demolición a la vista de las condiciones del medio: catalizadores presentes, concentración de la sustancia reaccionante, presión de oxígeno, acidez, etc.

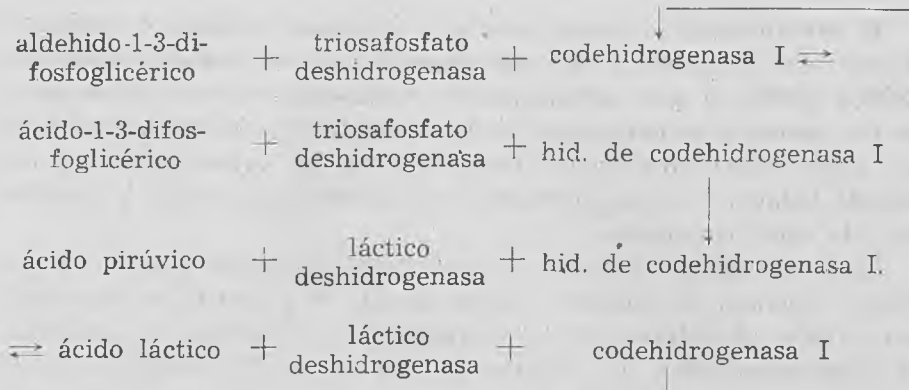
METABOLISMO ANAEROBIO DEL PIRUVATO

A partir de la formación de ácido pirúvico, la demolición anaerobia de los hidratos de carbono sigue caminos distintos en el músculo y en las levaduras. En uno y otras, ya no hay dismutación de la triosafosfato con producción de ácido-3-fosfoglicérico y ácido α -glicerofosfórico, como ocurría en los primeros momentos, sino que después de la separación de ácido pirúvico la óxido-reducción toma otros rumbos.

a) En el músculo, el hidruro de codehidrogenasa I, que se formó en la reacción número 8, por oxidación del aldehído-1-3-difosfoglicérico con triosafosfatodeshidrogenasa, se desprende de esta apoenzima, y en unión con la lácticodeshidrogenasa reduce el ácido pirúvico a ácido láctico. De esta manera el hidruro de coenzima I pasa a la forma oxidada, y en combinación con la triosafosfato-deshidrogenasa oxida nuevas moléculas de aldehído-1-3-difosfoglicérico. Así, el hidruro de coenzima I queda en condiciones de repetir la reducción de otras moléculas de ácido pirúvico a ácido láctico y de proseguir la reacción hasta agotar el triosafosfato.

El potencial redox del sistema coenzima \rightleftharpoons hidruro de coenzima I es $E_0' = -0,270$ volt.; y el del par piruvato-lactato es $E_0' = -0,176$ volt., lo que termodinámicamente significa que, en ausencia de oxígeno, el piruvato se reduce a lactato, si no hay presente otro sistema redox más positivo.

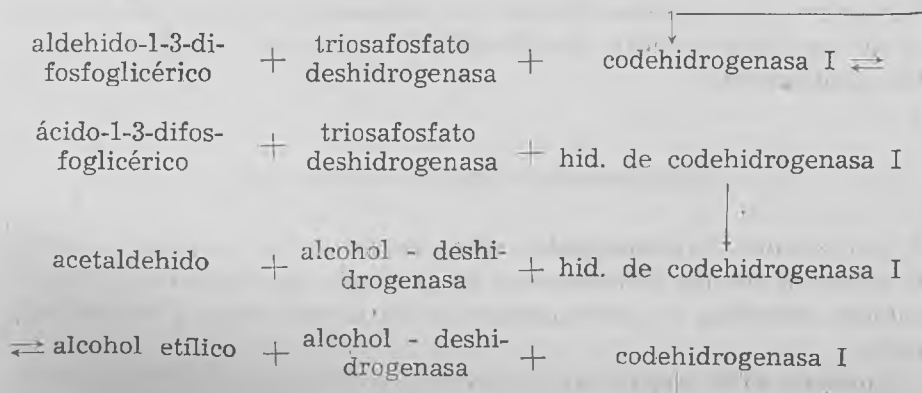
Los fenómenos de óxido-reducción tienen lugar en la fermentación láctica o en la glucólisis del músculo, conforme indica el siguiente esquema:



b) En la fermentación alcohólica con levaduras, el ácido pirúvico sufre una descarboxilación con la *carboxilasa* y se transforma en acetaldehido y gas carbónico. A continuación, el aldehido acético es reducido a alcohol etílico por el hidruro de coenzima I que quedó libre en la reacción número 8; basta para ello que se desprenda de la triosafosfato-deshidrogenasa y se cuelgue a la alcohol-deshidrogenasa, En un proceso análogo al que se ha descrito para la formación de ácido láctico se produce alcohol etílico y tiene lugar la *fermentación alcohólica*.

El potencial redox del sistema acetaldehido-alcohol es $E_0' = -0,190$ volt. a $\text{pH} = 7$; y el del sistema coenzima I-hidruro de coenzima I importa $E_0' = -0,270$ volt. Por tanto, en ausencia de oxígeno no hay dificultad termodinámica para que la reducción del acetaldehido a alcohol etílico se realice íntegramente.

Las reacciones que interpretan la formación de etanol a partir de acetaldehido se expresan con el esquema

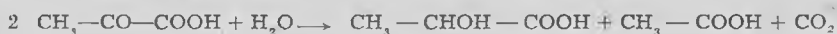


El acetaldehído, el ácido pirúvico o el ácido oxalacético oxidan el hidruro de coenzima I con más rapidez que la dioxiacetona-fosfato (319) y (320); lo que explica que en el músculo se forme ácido láctico (en ausencia de oxígeno) y en la fermentación alcohólica, etanol, y no ácido α -glicerofosfórico. Únicamente en los primeros momentos, cuando todavía no se ha formado ácido pirúvico, es posible la producción de aquel compuesto.

La fermentación alcohólica se interrumpe agregando bisulfito al sistema; entonces, el aldehído reacciona con él y pierde su capacidad para oxidar al hidruro de codehidrogenasa I. En tales circunstancias, la dihidroxiacetona, el dioxiacetonafosfato o el aldehído-3-fosfoglicérico se encargan de realizar la oxidación del hidruro de coenzima I, y, como consecuencia, en lugar de alcohol se produce ácido α -glicerofosfórico, que una fosfatasa hidroliza después dejando en libertad glicerina. Pero la afinidad de la proteína activante es 20.000 veces mayor para el acetaldehído que para la dihidroxiacetona; y como de los tres compuestos mencionados ninguno supera a ésta en actividad (321), la conversión de glucosa o glucógeno en glicerina por fermentación en medio bisulfítico transcurre siempre con lentitud.

c) En los tejidos animales originase acetato como producto normal del catabolismo anaerobio de piruvato. La reacción se debe a la acción conjunta que produce la descarboxilasa y la pirúvicodeshidrogenasa.

Krebs y Johnson interpretan la reacción admitiendo que primero el ácido pirúvico se descarboxila y forma aldehído, y después se produce una óxido-reducción entre éste y el ácido pirúvico que da lugar a ácido acético y ácido láctico. La reacción total se expresa así:



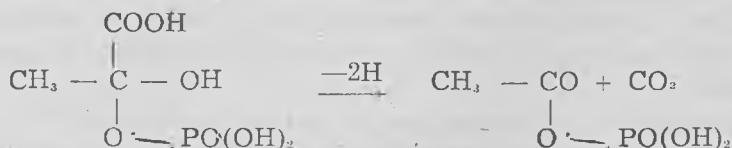
Probablemente la óxido-reducción va acompañada de una fosforilación en que se produce ácido acetilfosfórico (Lipmann), según se expondrá seguidamente.

METABOLISMO AEROBIO DE PIRUVATO

Los estudios experimentales sobre oxidación de piruvato a acetato en medio aerobio hiciéronse en un principio con bacterias, y los resultados obtenidos se generalizaron en los últimos años a tejidos animales.

Lipmann (323) trabajó con *Lactobacillus Delbrücki*, en presencia de

oxígeno, y Banga (324), Ochoa (325) y Peters (326), con dispersiones de cerebro de paloma. Unos y otros comprobaron que para la oxidación de ácido pirúvico a ácido acético hacen falta: la proteína específica de la pirúvico-deshidrogenasa, difosfotiamina, ácidos dicarboxílicos C., una flavina, iones Mg^{++} y fosfatos inorgánicos. Originase acetato y gas carbónico y aparece acetilfosfato como producto intermedio (327). Lipmann (328) y (329) interpreta la acción de la pirúvico-deshidrogenasa suponiendo que, en primer término, hay transfosforilación del ácido pirúvico por la ATP con formación de ácido fosfopirúvico. Seguidamente, según Lipmann, la pirúvico-deshidrogenasa oxida y descarboxila a este ácido separando un producto intermedio, el ácido acetilfosfórico, de considerable contenido energético, ya que en la hidrólisis deja libres 15 Kcal/mol.



A continuación la ADP defosforila al ácido acetilfosfórico y da lugar a ácido acético y ATP. Finalmente, el hidrógeno arrancado reduce otra mol. de ácido pirúvico a láctico, si el medio es anaerobio, o se quema con oxígeno, si es aerobio.

Clark (330) y Lipmann (331) creen que en esta reacción el hidrógeno se fija a la difosfotiamina para producir una *leucoforma*, que se oxida a continuación con algún sistema electroactivo; sin embargo, hasta la fecha, la suposición de aquellos autores no ha sido confirmada. En todo caso, la descarboxilación del ácido pirúvico es una descarboxilación oxidativa, diferente de la que realizan las levaduras con la carboxilasa. Del importante papel que en los actuales momentos se atribuye a la descarboxilación oxidativa del piruvato para interpretar la oxidación de los carbohidratos, conocerá el lector tan pronto exponamos el ciclo de Krebs.

Creíase hasta hace poco que los tejidos animales metabolizaban difícilmente el acetato; las únicas pruebas positivas en favor de su oxidación fueron las de Thunberg y algún otro investigador. Thunberg (332) sugirió, en efecto, que el ácido succínico puede formarse por deshidrogenación de dos moléculas de ácido acético; lo que años después, en 1943, comprobaron Slade y Werkman (333) empleando un acetato que contenía el isótopo pesado C_{14} . Sin embargo, era evidente la resistencia que el acetato ofrecía a la oxidación. Por esto no tiene nada de extraño que, para interpretar la degradación oxidativa del ácido pi-

rúvico, se imaginaron derroteros distintos a la vía acetato. De estas dificultades surgió el ciclo de Krebs.

EL CICLO DEL ACIDO CITRICO DE KREBS

La combustión del ácido pirúvico en los tejidos animales presupone un mecanismo que orille su resistencia a la oxidación. Hasta hace un decenio, poco se sabía con seguridad acerca de las reacciones que tienen lugar en este proceso; se sentaron hipótesis sugestivas fundadas en experiencias con suspensiones de músculo pectoral de paloma, en medios conteniendo fosfato, pero se desconocía hasta qué punto los fenómenos que ocurren en las células se ajustan a los resultados que dieron aquellos trabajos experimentales. En esta penosa labor distinguieron Krebs, Johnson, Martius, Knoop y otros colaboradores (334 a 337). Sus observaciones han permitido formular los siguientes postulados:

a) Los citratos, lo mismo que los ácidos dicarboxílicos C_4 , catalizan la respiración de músculo pectoral de paloma y provocan un consumo de oxígeno superior al que hace falta para oxidar el citrato.

b) Los productos de oxidación del ácido cítrico son, entre otros, el ácido α -cetoglutárico y el ácido succínico.

c) Cuando se añade oxalacetato a suspensiones de músculo, en condiciones anaerobias, aquél se condensa con ácido pirúvico y da lugar a ácido cítrico. El rendimiento en citrato es pequeño, pues a medida que se forma, se oxida a α -cetoglutarato, como lo prueba el hecho de que en presencia de arsenitos, que inhiben la oxidación de ácidos α -cetónicos, se acumulen cantidades apreciables de ácido α -cetoglutárico.

d) El succinato se produce en el músculo por reducción de oxalacetato y fumarato (338); pero también se origina por vía oxidativa, a partir de piruvato y fumarato, o a partir de citrato, cuando hay oxígeno disponible.



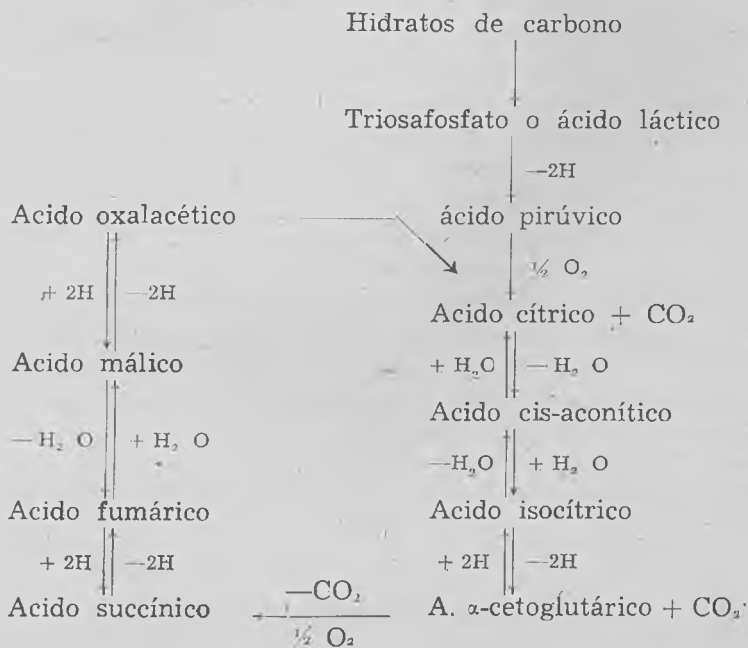
Lo prueba así el hecho de que la reacción no se inhiba con fuertes cantidades de malonato, que suprime la acción de la succinodeshidrogenasa y, por tanto, la vía reductiva, demostrando con ello que hay otro camino para la producción de ácido succínico distinto al de la hidrogenación del fumarato.

La última conclusión, la más importante de las cuatro, exige un ciclo de oxidaciones en el que los ácidos dicarboxílicos C_4 se regeneren periódicamente; en ese ciclo los peldaños intermedios por los que hay que descender para pasar del oxalacetato al succinato, vía oxidativa, los señalan las tres conclusiones primeramente enunciadas.

El esquema adjunto da cuenta del ciclo del ácido cítrico tal como Krebs (339) lo formuló en 1937. Dicho esquema es imagen detallada, aunque no completa, de los peldaños por que pasan los carbohidratos para su oxidación en el músculo; interpreta la formación oxidativa de citrato y succinato a partir de piruvato y oxalacetato; y muestra el carácter catalítico que tienen los ácidos dicarboxílicos C_4 y el ácido cítrico en el ciclo de Krebs.

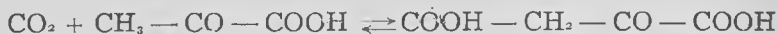
CICLO DEL ACIDO CITRICO O DE KREBS

(1 9 3 7)



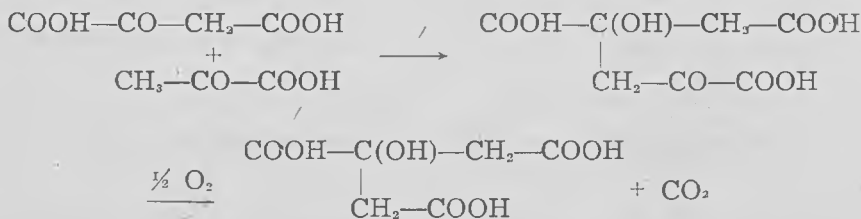
En experimentos practicados con suspensiones de músculo pectoral de paloma, Krebs y Eggleston (340) comprobaron que para la oxidación del piruvato precisan pequeñas cantidades de oxalacetato. Por fortuna, el ácido oxalacético no falta nunca en los tejidos; lo sumi-

nistran el ácido glutámico en su deshidrogenación y descarboxilación, y el ácido aspártico en las reacciones de transaminación; además, se produce por síntesis, mediante fijación de anhídrido carbónico al ácido pirúvico.

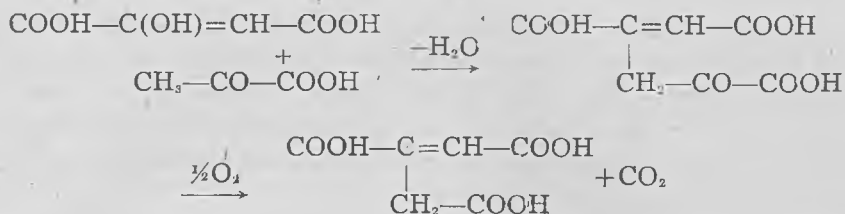


La reacción se conoce con el nombre de reacción de Wood y Werkman (341), y la cataliza, según Krebs y Eggleston (342), la difosfotiamina, y según Krampitz y Werkmann, la β -carboxilasa (343) del hígado en presencia de iones Mg^{++} . Hasta ahora, la síntesis del oxalacetato sólo se ha comprobado en hígado de paloma, pero probablemente tiene lugar también en otros tejidos. Wood (344) y Evans y Slotin (345) la llevaron a cabo con CO_2 preparado con el isotopo pesado C_{13} y con el radiactivo C_{11} , respectivamente; uno y otros dedujeron de sus trabajos experimentales que en la síntesis del oxalacetato la molécula de gas carbónico se enlaza al ácido pirúvico por el carbono del grupo CH_3 , ya que el ácido oxalacético resultante responde a la fórmula $\text{COOH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{*COOH}$, en el que el carbono radiactivo C_{11} o el pesado C_{13} es el marcado con asterisco.

En opinión de Martius y Knoop (346), el oxalacetato se condensa a continuación con piruvato, en presencia de aire, y da lugar a citrato. Ahora bien, el citrato aparece mezclado a cis-aconitato e isocitrato, porque la *aconitasa* determina entre estos cuerpos un equilibrio en el que hay 80 % de citrato, 4 % de cis-aconitato y 16 % de isocitrato. Interesa, por tanto, averiguar cuál de los tres compuestos se formó en primer término en la condensación de piruvato con oxalacetato. Para resolver la cuestión, bastaría saber si el oxalacetato reacciona en su forma cetónica o en su forma enólica. Si actúa en la forma cetónica, debe producirse ácido cítrico con separación intermedia de un ácido inestable.



En cambio, si el oxalacetato reacciona en la forma enólica, dará lugar a ácido cis-aconítico con producción intermedia de ácido oxal-citraónico.

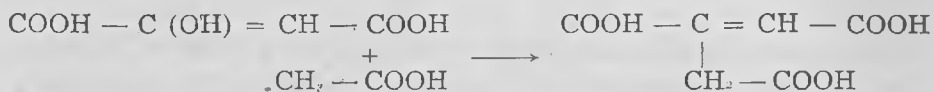


La solución la han dado Evans y Slotin (347) y Wood y Werkman (348). En sus experimentos con hígado de paloma, estos investigadores condensaron ácido pirúvico con ácido oxalacético marcado por el isótopo pesado C_{13} en el carboxilo adyacente al grupo CH_2 y oxidaron los productos de la reacción hasta obtener ácido α -cetoglutarico. Las reacciones anteriores explican que si la condensación se efectúa con la forma cetónica del ácido oxalacético, los dos carboxilos del ácido α -cetoglutarico deben contener el isótopo C_{13} ; mientras que si reacciona la forma enólica, el isótopo C_{13} debe aparecer únicamente en el carboxilo contiguo al grupo cetónico. Ante la sorpresa de los citados investigadores comprobóse que el ácido α -cetoglutarico obtenido en la síntesis se compone de moléculas con un solo carboxilo señalado con carbono $^*\text{C}_{13}$: el situado en posición α respecto al grupo cetónico; prueba de ello que en la descarboxilación oxidativa de este ácido se origina ácido succínico exento de carbono pesado y CO_2 con isótopo C_{13} . De acuerdo con estos resultados, el ácido cítrico dejó de ser eslabón del ciclo del ácido cítrico y pasó a la categoría de producto secundario del ciclo de Krebs.

Como eslabones del ciclo de Krebs aparecen el ácido oxal-citracónico, el cis-aconítico y el isocítrico, pero no el cítrico, que, en expresión de Barrón, constituye un *cul-de sac*, como lo es el ácido láctico en la glucólisis del músculo. Su presencia en los tejidos, especialmente en la leche y en los huesos, se debe al equilibrio que determina la aconitasa, y probablemente sirve de reserva para reemplazar las moléculas de cis-aconitato que se transforman en trans-aconitato, metabólicamente inactivas.

Hasta la fecha, todos cuantos trabajos se han realizado para sorprender la presencia de trazas de ácido oxal-citracónico, han resultado infructuosos; puede ocurrir que este compuesto se descomponga instantáneamente en ácido cis-aconítico mediante descarboxilación oxidativa; pero si así fuera, la reacción se paralizaría en presencia de arsenitos, que inhiben las reacciones de este género, y su presencia no pasaría desapercibida. A causa de esto, se sospecha que no hay condensación de piruvato con oxalacetato, sino descarboxilación oxidativa

de piruvato; es decir, se supone que el piruvato pasa a acetato o quizás a acetilfosfato, si la descarboxilación oxidativa se efectúa con simultánea fosforilación, como opina Lipmann (349) En ese caso habrá que admitir que el acetato o el acetilfosfato se condensa por la acción de algún fermento con la forma enólica del ácido oxalacético y produce directamente cis-aconítico.



Dicho fermento pudiera ser la *citrogenasa* de Breusch (véase pág. 94). La reacción, caso de confirmarse, ofrecería excepcional interés, pues sin variar en nada la eficacia del ciclo de Krebs, permitiría explicar la suerte del ácido acético y la oxidación de ácidos grasos.

La deshidrogenación del ácido isocítrico la lleva a cabo la isocítricodehidrogenasa por medio de codehidrasa II, como coenzima, y de citocromo-c-reductasa, como transportador (350). En la reacción se separa ácido oxalsuccínico, que, por tratarse de un ácido α -cetónico complejo, es muy inestable: la oxalsuccínico-carboxilasa, en presencia de iones Mg^{++} , lo descompone inmediatamente en ácido α -cetoglutárico y gas carbónico.

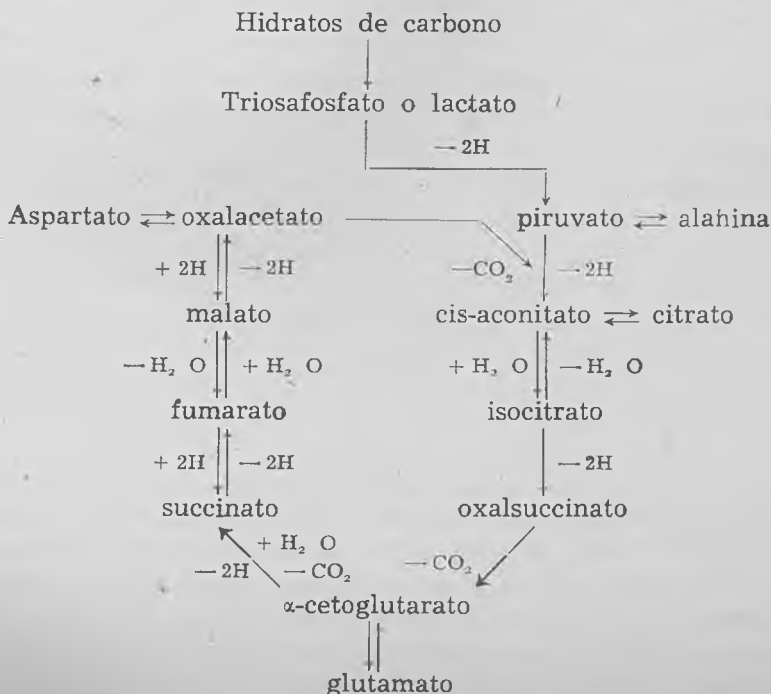
Tampoco se sabe gran cosa acerca del modo cómo el α -cetoglutarato se oxida a succinato. Green y colaboradores (351) creen que la α -cetoglutárico-carboxilasa (352) lo descarboxila y transforma en semialdehído succínico, compuesto que pasa a ácido succínico por deshidrogenación sucesiva. Se ignora cuál puede ser la deshidrogenasa específica de esta oxidación. Barrón y colaboradores (353) la atribuyen a una descarboxilación oxidativa en la que interviene la difosfotiamina; y Ochoa la cree producida por una enzima que cataliza la oxidación del α -cetoglutárico a ácido succínico, y que él asegura haberla encontrado en extractos dializados de músculo cardíaco de gato.

Algunos de los razonamientos anteriores han sido tomados de la monografía que con el título «The Intermediary Stages in the Biological Oxidation of Carbohydrates», publica Krebs en *Advances in Enzymology*. Vol. III.—1943. El ciclo del ácido cítrico, en opinión de Krebs, debería designarse en lo sucesivo con el nombre de «Ciclo de los ácidos tricarbónicos», en razón al papel desempeñado en él por los ácidos cítrico, cis-aconítico e isocítrico. Sin embargo, la mayoría de los escritores lo continúan denominando «Ciclo de Krebs», en honor a su autor, y en atención a que todavía no se ha dicho sobre él la última palabra. El esquema de la página 87 muestra la disposición que Krebs

le asigna en el citado trabajo, y el de la página 88 la que habrá que darle si se confirman las nuevas hipótesis acerca de la condensación del acetato con oxalacetato. En este esquema el ácido pirúvico queda fuera del ciclo y su papel lo desempeña el ácido acético.

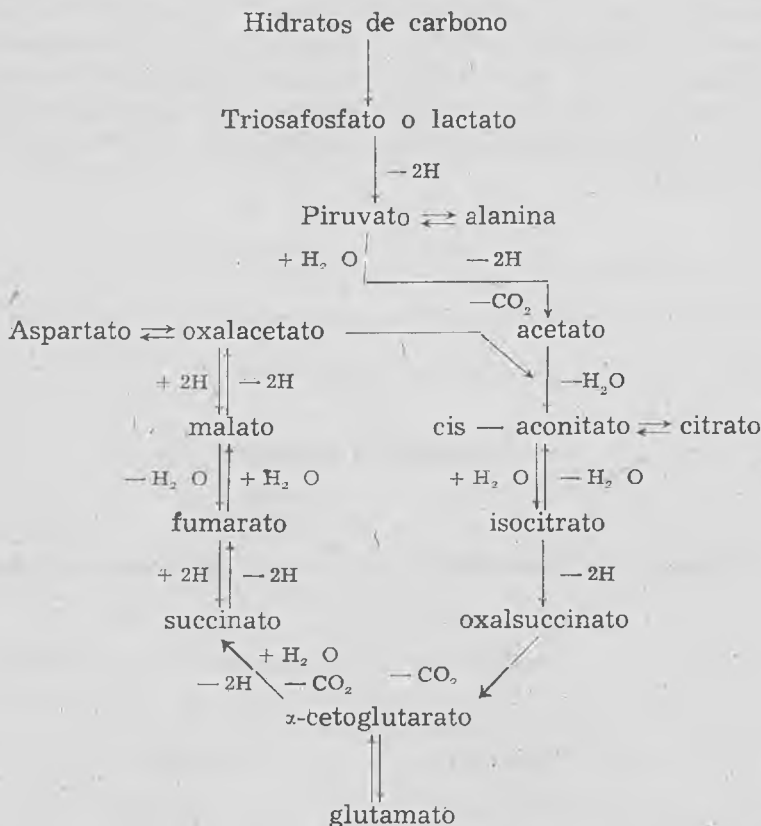
Sea cualquiera el que se acepte, es lo cierto que en cada recorrido del ciclo una molécula de ácido pirúvico se oxida consumiendo una de oxalacetato, que al final del mismo reaparece, lo que demuestra que el ácido oxalacético se comporta como catalizador. Si se acepta el esquema de Krebs de 1943, obsérvase que en cada giro hay desprendimiento de tres moléculas de gas carbónico (correspondientes a los tres carbonos de la molécula de ácido pirúvico quemado) y separación de cinco pares de átomos de hidrógeno, de los que dos proceden de la molécula del ácido pirúvico, y tres de las tres moléculas de agua que se fijaron en el curso de las reacciones oxidativas. Por tanto, en cada recorrido completo del ciclo de Krebs una molécula de ácido pirúvico se quema íntegramente con separación de tres moléculas de CO_2 y dos de H_2O .

CICLO DE KREBS
(1 9 4 3)



Si se retrotraen los hechos a la oxidación del triosafosfato, obsérvese igualmente que en la oxidación de una mol. de triosafosfato se separan 3 mol. de CO_2 y 6 pares de átomos de hidrógeno, de los que tres proceden de la triosafosfato y los restantes de las tres moléculas de agua que necesitó el proceso para su realización. De donde resulta que en cada recorrido del ciclo de Krebs una mol. de triosa se oxida y quema desprendiendo tres mol. de CO_2 y 3 mol. de H_2O .

C I C L O D E K R E B S
(1 9 4 7)



De modo análogo, el esquema 1947 muestra que en cada giro hay desprendimiento de dos moléculas de CO_2 , correspondientes a los dos carbonos del acetato, y separación de cuatro pares de átomos de hidrógeno, dos de los cuales proceden del ácido acético y otros dos de las dos moléculas de agua que se fijan durante el ciclo; es decir, que en cada giro se quema totalmente una molécula de ácido acético.

El ácido pirúvico o el ácido acético y la triosa son incapaces de quemarse directamente con el oxígeno del aire; sin embargo, en las células, unos y otros se oxidan de modo suave y rápido a través de este artificio complicado. He aquí por qué Franke juzga el ciclo de Krebs como el mecanismo que mejor interpreta la oxidación de los carbohidratos.

Szent-Györgyi atribuyó a los ácido dicarboxílicos C_4 el papel de transportadores de hidrógeno exclusivamente. En cambio, en opinión de Krebs, son combustibles que arden sin agotarse, porque el carbohidrato los regenera a medida que el oxalacetato se condensa con ácido acético o pirúvico. Mientras que el ciclo de Szent-Györgyi sólo interpreta la deshidrogenación de algún producto intermedio del metabolismo de los hidratos de carbono, el de Krebs da cuenta de la oxidación completa del glucógeno y de la glucosa. Ocurre con los ácidos acético y pirúvico al entrar en el ciclo de Krebs algo análogo a lo que acontece con las hullas y lignitos al gasificarse o licuarse: unos y otros carbones arden con dificultad en estado sólido, pero una vez gasificados en las fábricas de gas, o licuados en las de petróleo sintético, se queman con extrema rapidez; así también, aquellos ácidos tan resistentes a los medios oxidativos ordinarios se queman suavemente en las células cuando fermentos adecuados los condensan con ácido oxalacético y les obligan a recorrer el ciclo de Krebs.

Sería interesante averiguar cuántos pares de átomos de hidrógeno llegan al sistema citocrómico a través de los ácidos dicarboxílicos C_4 , de los seis que se separan en la oxidación de un equivalente de triosa. Las dificultades técnicas y operatorias con que los investigadores tropiezan para resolver esta cuestión no permiten llegar, por ahora, a una conclusión definitiva. La bibliografía nada aclara, y los científicos de mayor relieve muestran opiniones discrepantes. A juicio de la mayoría de los autores, la transferencia del par de átomos de hidrógeno que suelta la triosafosfato en su oxidación, se realiza por medio del ácido oxalacético (355) y (356); pero en los restantes procesos oxidativos que tienen lugar en el ciclo de Krebs, no puede asegurarse nada respecto al camino que sigue el hidrógeno hasta llegar al sistema citocromoxidasas: unas veces, porque ignoramos cuáles son las deshidrogenasas activas, y otras, como sucede con la isocítricodeshidrogenasa, porque hay duda de que su cofermento, la codehidrasa II, sea capaz de oxidar su hidruro con el ácido oxalacético. En el momento actual, se admite *provisionalmente* que de los seis pares de átomos de hidrógeno que se liberan en la oxidación de un equivalente de triosa, tres, por lo menos, circulan a través del sistema transportador de Szent-Györgyi.

El ciclo del ácido cítrico ha sido objeto de las más acerbas críticas, mayores si cabe que las que se hicieron al del investigador húngaro, sin que se pueda predecir nada acerca de su suerte. A pesar de ello, ambos mecanismos de oxidación biológica continúan estimulando numerosas investigaciones. Pruebas en favor del ciclo de Krebs las proporciona Smyth (357), por cuanto ha generalizado los experimentos hechos con músculo pectoral de paloma a músculo cardíaco de oveja y a otros tejidos animales; y Banga, Ochoa y Peters (358), por haberlo comprobado en preparados de cerebro. En cambio, Bauman y Stare (359) niegan al ciclo de Krebs su carácter funcional, ya que, a su juicio, el ácido cítrico no elimina la inhibición que provoca el ácido málico; pero quizás más dañosa es la posición de Barrón, quien lo juzga de *artefacto lógico, aunque pintoresco*.

En los tejidos animales, donde existe el grupo de enzimas necesario para este proceso, el ciclo del ácido cítrico se cumple. En plantas donde se encuentren los ácidos dicarboxílicos C₄, así como la fumarasa y aconitasa, el ciclo puede ser también una realidad, aunque no hay pruebas de que la oxidación de carbohidratos se efectúe con arreglo a él, porque las investigaciones realizadas hasta la fecha son escasas y sus resultados oscuros. En cambio, en levaduras y otros seres inferiores no puede esperarse que la oxidación de hidratos de carbono se realice a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por cuanto faltan en ellos los agentes enzimáticos necesarios.

A juicio de Krebs, los distintos sistemas que se han formulado para explicar los peldaños intermedios que recorren los hidratos de carbono en su desmoronamiento oxidativo, pueden ser *incompletos*, pero no *incorrectos*. Se han ideado a base de hechos experimentales; y si es cierta la afirmación de Hopkins de que «el organismo no realiza otras reacciones que aquéllas a que está acostumbrado», cabe asegurar que cuando un tejido o una célula tienen capacidad para reaccionar de determinado modo, es porque así trabajan en estado fisiológico, y así se conducen durante el metabolismo normal del tejido.

OXIDACION DIRECTA DE CARBOHIDRATOS

Como ya se ha advertido, la vía ordinaria de demolición oxidativa de hidratos de carbono comienza por una fase anaerobia (glucolisis o fermentación), y continúa con la desintegración del ácido pirúvico en medio aerobio. No es otro el camino que sigue el glucógeno y el almidón, ni diferente el itinerario que utilizan las hexosas y disacáridos.

En efecto, las hexosas dan lugar a hexosa-6-fosfato en presencia de *hexoquinasa* u otros fermentos, y los disacáridos pasan a glucosa-1-fosfato en la *fosforolisis* con la fosforilasa respectiva; de esta manera, unos y otros compuestos entran en la vía común de demolición del glucógeno o almidón y se desintegran oxidativamente en la misma forma que ellos. Sin contar que la transformación de glucosa en glucógeno tiene lugar con arreglo a las reacciones siguientes:



que en condiciones adecuadas realizan los fermentos correspondientes.

A pesar de todo, en los tejidos animales una parte de las hexosas se oxida directamente en medio aerobio. Así, Lundsgaard (360) observó que en la respiración del músculo, en presencia de iodoacetato, como inhibidor de la glucolisis, el consumo de oxígeno, aunque muy disminuído, permanece inalterable; y Barker y colaboradores (361) llegaron a conclusiones semejantes trabajando con músculo cardíaco o suspensiones de tejido cerebral; en estas condiciones, la aldehidofosfoglicérideshidrogenasa no interviene, y la glucolisis se paraliza por causa del iodoacetato. Warburg y Christian (362) demostraron, asimismo, que la glucosa-6-fosfato se oxida en tejidos animales con la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y coenzima II. En levaduras se ha comprobado la oxidación de maltosa. En hongos y bacterias la de glucosa a ácido glucónico y a ácido α -cetoglucónico; y la de hexosa-6-fosfato a ácido fosfohexónico. En algunas bacterias aerobias, capaces de oxidar glucosa, pero no de fermentarla, se suplanta la glucolisis por una oxidación de los hidratos de carbono.

De todos los ejemplos de oxidación directa citados, el de la hexosa-6-fosfato parece el más general. La inicia la hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa, por cuya intervención y la de coenzima II se convierte aquélla en ácido-6-fosfoglucónico; y la continúa la fosfoglucónico-deshidrogenasa con la misma coenzima. En la oxidación se produce primero ácido-2-ceto-fosfoglucónico, y después una pentosa (363), probablemente la d-ribosa-5-fosfato, que da las reacciones coloreadas de las pentosas, y seguidamente ácidos fosfopentónico y fosfoeritrónico (364); finalmente se separa ácido fosfoglicérico. Los trabajos de Lipmann (363) dan a entender que quizás intervengan en ese sistema dos proteínas específicas: la proteína I y la II. La proteína I oxidaría a la pentosa-fosfato en ácido fosfopentónico; y la proteína II continuaría la oxidación de este ácido hasta dejar en libertad ácido fosfoglicérico. Las oxidaciones de hidratos de carbono que se realizan sin fosforilación simultánea no

tienen interés más que en mohos y bacterias saprofitas (Barrón). A medida que los organismos avanzan en su proceso evolutivo, decaen más y más los métodos de desintegración citados, y en los seres superiores sólo representan un recuerdo de procesos ancestrales a los que acude el organismo en los contados casos en que la fosforilación se interrumpe.

METABOLISMO OXIDATIVO DE ACIDOS GRASOS

Lo conocimientos que hasta hoy poseemos acerca de la oxidación de grasas son oscuros y la literatura muy escasa. Créese que los glicéridos se oxidan una vez han sido escindidos en glicerina y ácidos grasos. Separados ambos componentes, la glicerina se fosforila y convierte en ácido glicerofosfórico, en cuya forma entra en la vía de demolición oxidativa de carbohidratos. Los ácidos grasos, por su parte, arden desprendiendo agua y gas carbónico; o dan lugar, en estados que se consideran patológicos, a acetona y cuerpos cetónicos (ácido acetoacético y ácido β -hidroxibutírico, principalmente).

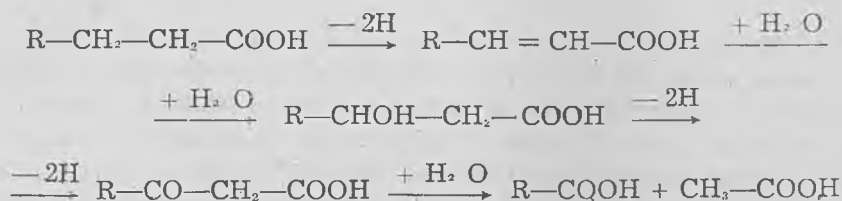
La oxidación normal de los ácidos grasos tiene lugar en el hígado, con arreglo al principio de la β -oxidación de Knoop. De acuerdo con este mecanismo, en cada peldaño de oxidación se forma un ácido graso con dos átomos menos de carbono, y se separa una molécula de ácido acético acortándose la cadena hasta producir ácido butírico, de cuya β -oxidación deriva ácido acetoacético, y, finalmente, acetato.

A nada práctico conduciría aportar pruebas en apoyo de la hipótesis de Knoop, que los bioquímicos aceptan como indiscutible para interpretar la oxidación de ácidos grasos. En los últimos años se ha seguido la marcha oxidativa de éstos, administrando a los animales con que se efectúan las experiencias, grasas convenientemente *señaladas* con algún átomo de deuterio. Los resultados de estos trabajos manifiestan que empleando ácido esteárico *marcado*, se logra caracterizar ácido palmítico y otros ácidos inferiores de número par de átomos de carbono, todos ellos *señalados* con idéntico tatuaje.

Utilizando grasas que contengan un átomo de carbono radiactivo se ha comprobado que, conjuntamente con la β -oxidación, algunas moléculas de ácidos grasos con más de ocho átomos de carbono, en particular los de 9, 10 y 11, sufren la ω -oxidación, es decir, la oxidación del grupo metilo opuesto al carboxilo (Verkade). En todo caso, la ω -oxidación de los ácidos grasos naturales de 14, 16 y 18 carbonos tiene lugar

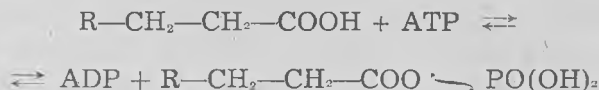
en proporción muy reducida, y los ácidos dicarboxílicos originados se desmoronan seguidamente con arreglo al principio de la β -oxidación de Knoop.

La β -oxidación la realizan enzimas de naturaleza poco conocida, designadas con el nombre de *ácidos grasos-deshidrogenasas*, y tiene lugar por el mecanismo siguiente:



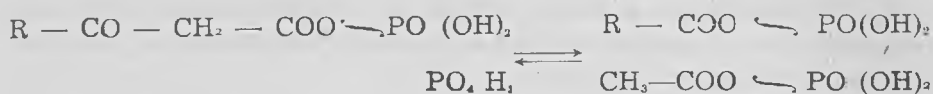
Las reacciones son análogas a las que se producen en el paso de ácido succínico a ácido oxalacético, y se suceden en el mismo orden. Sin embargo, aunque todas fueran factibles de realizarse, no parece probable que la hidrólisis de los ácidos β -cetónicos tenga lugar en las condiciones de temperatura y pH del organismo, a no ser que la catalice alguna enzima especial desconocida por ahora.

En el momento actual, y por analogía con lo que sucede en los procesos oxidativos de los carbohidratos, se admite como posible, y aun como probable, que la oxidación de los ácidos grasos se realice mediante reacciones de fosforilación acopladas a las de oxidación. Los trabajos de Lehninger comprueban, en efecto, que los acilfosfatos son mejor atacados en el hígado que los ácidos libres; y, en consecuencia, se supone que, en primer término, hay una transfosforilación del ácido graso conforme al esquema.



A causa del enlace fosfático de alto contenido energético, se atribuye al acilfosfato resultante mayor capacidad de reacción que a los ácidos grasos libres, y se supone que puede ser deshidrogenado más fácilmente. En la oxidación se produce un ácido β -cetónico de fórmula $\text{R-CO-CH}_2\text{-COO} \curvearrowright \text{PO(OH)}_2$ que constituye la clave del mecanismo oxidativo de los ácidos grasos. En efecto, admítase hoy, con razones superiores a las de una simple sospecha, que estos ácidos sufren una descomposición *fosforolítica*, en virtud de la cual separan

acetilfosfato y el ácido graso de dos carbonos menos, fosforilado a su vez en el grupo carboxílico.

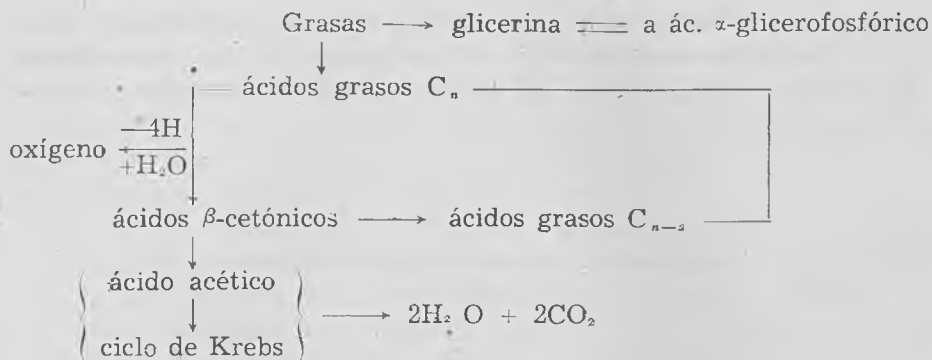


El ácido graso con el radical fosfórico de alta energía en su grupo carboxílico, sufre de nuevo la β -oxidación y la fosforolisis, y engendra un nuevo ácido graso fosforilado con otros dos carbonos menos que el anterior; el proceso oxidativo continúa así hasta desmoronar la cadena y llegar al ácido acetilfosfórico. Obsérvese que en cada peldaño de estos procesos queda en libertad una molécula de acetilfosfato. Por tanto, después de lo expuesto al interpretar la oxidación de los carbohidratos, cabe suponer que el acetilfosfato se integre en el ciclo de Krebs condensándose con oxalacetato para producir cis-aconitato.

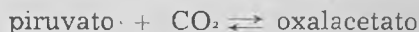
De esta manera, mediante procesos de transfosforilación acoplados a reacciones sucesivas de deshidrogenación y de fosforolisis, nos es dado interpretar la combustión de los ácidos grasos hasta separar acetato, y explicar, finalmente, la suerte del acetato, admitiendo que se oxida a través del ciclo de Krebs.

Recientemente, Breusch (366) sugirió la idea de que el ácido cítrico sea un producto intermedio en la oxidación de grasas, puesto que al agregar glicéridos a suspensiones de músculo cardíaco de rata, en presencia de malonato, se forma abundante citrato (367). En 1939, Breusch aisló de riñón, músculo y cerebro una enzima, la *citrogenasa* (368), que cataliza la condensación de ácidos β -cetónicos con oxalacetato; en la reacción se produce citrato y un ácido graso con dos carbonos menos que el ácido β -cetónico generador. Después de lo expuesto en párrafos anteriores, cabe interpretar las observaciones de Breusch suponiendo que la *citrogenasa* sea un fermento complejo en el que haya una fosforilasa que desdoble el ácido β -cetónico, conforme a la reacción de fosforolisis, ya indicada anteriormente, y un factor que catalice la condensación de la forma enólica del oxalacetato con el acetato o el acetilfosfato. Nuevas investigaciones precisan para resolver el enigma; en todo caso, si así sucede, la *citrogenasa* sería el fermento que incorporase el acetilfosfato al ciclo de Krebs para su total oxidación (369). Por ahora resulta prematuro formular ningún juicio.

De acuerdo con los razonamientos señalados, el esquema de oxidación de ácidos grasos puede representarse así:

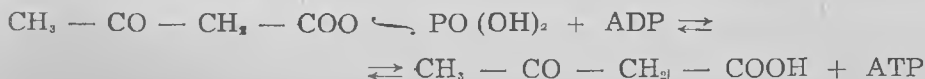
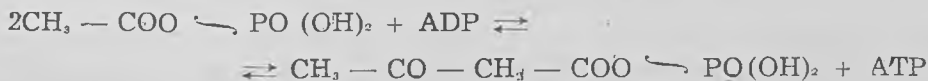


El mecanismo de fosforilación y fosforólisis anteriormente expuesto, conjuntamente con la β -oxidación de ácidos grasos, interpreta también la producción de cuerpos cetónicos. Aparecen estos compuestos, en efecto, cuando el metabolismo de hidratos de carbono se debilita por escasez de glucógeno en hígado; entonces, por causa de la deficiencia de glúcidos escasea el ácido pirúvico, y es también exigua la cantidad de oxalacetato producida en la reacción reversible



que cataliza en hígado la β -carboxilasa. Se comprende que, en estas condiciones, el acetato se oxide difícilmente, porque el mecanismo del ciclo de Krebs funciona con lentitud; para evitar la deficiencia de combustible, en este caso de carbohidratos, se metabolizan mayores cantidades de grasas y, como consecuencia, tiene lugar una acumulación de acetato con la consiguiente dificultad para oxidarse.

El exceso de acetato que así se produce, no pudiendo quemarse, se condensa con otra molécula de ácido acético y origina ácido acetoacético. Probablemente, la reacción la lleva a cabo el acetilfosfato, y se cumple acoplada a una transfosforilación con ADP, en que la energía libre del enlace fosfático pasa íntegra a la ATP formada.



Una vez producido el acetoacetato, parte de él se convierte en ácido β -hidroxibutírico por la influencia de la ácido- β -hidroxibutírico-des-

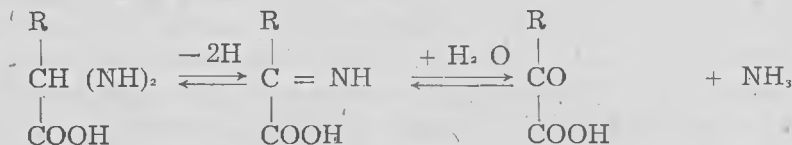
hidrogenasa, y otra porción pasa a acetona por descarboxilación espontánea. Con dichas reacciones puede interpretarse la aparición de cuerpos cetónicos sin necesidad de atribuirlos a un metabolismo anormal de ácidos grasos.

METABOLISMO OXIDATIVO DE AMINOACIDOS

La degradación oxidativa de albúminas tiene lugar después de diversas acciones hidrolíticas que rompen los enlaces pépticos y dejan libres los aminoácidos. Estos se oxidan a continuación en agua, gas carbónico y amoníaco.

Dos itinerarios fundamentales conducen a la demolición de aminoácidos: uno, la desaminación oxidativa mediante la d-aminoácidoxidasa o la l-aminoácidoxidasa; y otro, la transaminación acoplada a una oxidación con la glutámicodehidrogenasa. Ningún otro mecanismo oxidativo ofrece interés, pues la descarboxilación previa no representa un proceso general de este tipo en el catabolismo de aminoácidos.

a) La mayoría de los l-aminoácidos o aminoácidos naturales se oxidan por la l-aminoácidoxidasa dando lugar a ácidos cetónicos de igual número de átomos de carbono. Lo mismo ocurriría con los d-aminoácidos, caso de que se produzcan en los procesos de síntesis; la d-aminoácidoxidasa los desaminaría oxidativamente transformándolos en ácidos α -cetónicos. En uno y otro caso, el esquema de la reacción es como sigue:



Se desconoce a qué reacción de oxidación se acopla este fenómeno reductivo cuando se efectúa en anaerobiosis. En presencia de aire, el hidrógeno llega al sistema citocrómico a través del isoaloxacín-adenín dinucleótido, que constituye el grupo prostético de una y otra aminoácidoxidasa.

Los ácidos α -cetónicos originados en la reacción anterior entran en alguno de los ciclos de oxidación de hidratos de carbono (ácidos pirúvico y oxalacético) y en ellos se queman totalmente; o se descarbo-

xilan y convierten en ácidos grasos de un átomo menos de carbono y se oxidan después en la forma en que éstos lo hacen.

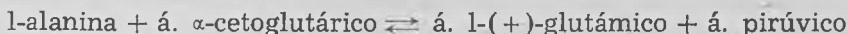
Transformación análoga sufre el ácido l-(+)-glutámico por la acción de la glutámico-deshidrogenasa. En este caso, el producto de la reacción es el ácido α -cetoglutárico, cuya intervención, en la oxidación de carbohidratos fué discutida con detalle.

b) La desaminación oxidativa de los l-aminoácidos tiene lugar, en gran parte, mediante cooperación de la glutámico-deshidrogenasa con las *aminotransferasas* o *transaminasas*. Estos fermentos catalizan la transferencia de grupos $-\text{NH}_2$ de una molécula a otra. Así, a las reacciones



las catalizan la *aspártico-transaminasa* y la *glutámico-transaminasa*; la última es de mayor interés en el reino animal y la primera en el vegetal.

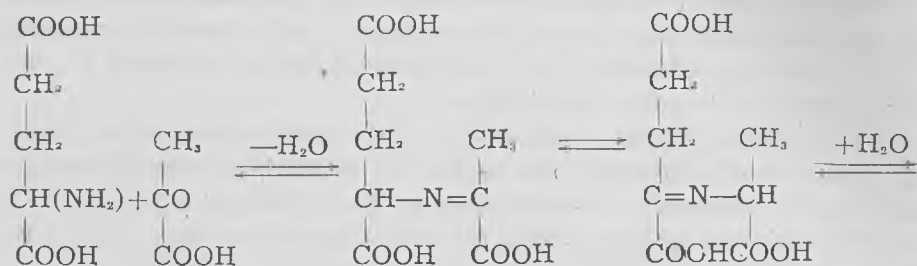
Para que haya transaminación precisa que uno de los ácidos sea α -cetónico y el otro α -aminodicarboxílico; o bien, uno α -aminoácido y el otro α -cetónodicarboxílico. Hace falta, además, que con la pareja de ácidos citados esté presente la glutámico-transaminasa y un poco de ácido glutámico o de ácido α -cetoglutárico. Estos ácidos actúan como *donadores* o *aceptores* de grupos $-\text{NH}_2$, y desempeñan papel análogo al que juega la coenzima I o la II y sus hidruros frente a las deshidrogenasas. Sin ellos, la transaminación no se efectúa, aun en presencia de la aminotransferasa. Así, en la mezcla de alanina y ácido oxalacético con glutámico-transaminasa no hay intercambio de grupos $-\text{NH}_2$; pero si se añaden trazas de ácidos glutámico o α -cetoglutárico, la transaminación es rápida y tiene lugar con arreglo a las reacciones siguientes:



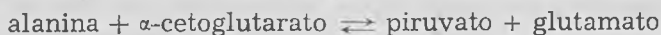
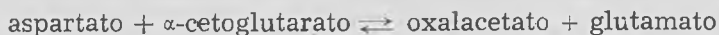
Por este mecanismo el ácido α -cetoglutárico queda en condiciones de transferir catalíticamente grupos $-\text{NH}_2$ desde la alanina al ácido oxalacético, o entre dos ácidos que reúnan las condiciones anteriormente dichas.

Braunhstein y Kritzmánn (370) interpretan la transaminación admitiendo que se forman compuestos intermedios, inestables, los cuales modifican sus enlaces por un fenómeno de tautomería o de resonancia.

cia; la reacción se completa con la hidrólisis espontánea del compuesto así formado.



Los conocimientos acerca de las transaminasas han sufrido en los últimos años un cambio profundo. Cohen (371) opina que sólo existen dos reacciones de transaminación, las dos siguientes:



Green (372) y colaboradores dan a los fermentos correspondientes los nombres de *aspártico-glutámico-transaminasa* y *alanina-glutámico-transaminasa*. El grupo prostético de una y otra aminoferasa es, a juicio de Schlenk (373) y Snell (374), el fosfato de piridoxal, es decir, la propia *codecarboxilasa* o grupo prostético de la *aminoácido-des-carboxilasa*.

Mediante dicha pareja de reacciones, el ácido aspártico y la alanina se desaminan y convierten en los ácidos α -cetónicos correspondientes, los ácidos oxalacético y pirúvico; y el ácido glutámico que queda libre se oxida a ácido α -cetoglutámico por la acción de la glutámico-des-hidrogenasa. Así se explica que en presencia de pequeñas cantidades de ácido glutámico prosiga indefinidamente la desaminación oxidativa de nuevas porciones de ácido aspártico y de alanina.

Con este sencillo mecanismo, las aminoferasas mantienen constante la proporción de ácidos glutámico y α -cetoglutámico, permitiendo que a través de ellos se conecte la demolición oxidativa de proteínas con la de carbohidratos, y que el ciclo de Krebs juegue también papel importante en la oxidación de numerosos compuestos nitrogenados. Tres aminoácidos: los ácidos glutámico, aspártico y aminopropiónico intervienen directamente en el ciclo del ácido cítrico, porque originan α -cetoglutarato, oxalacetato y piruvato; y otros cuatro o seis más toman parte en él después de su conversión en ácido glutámico: son

la histidina, arginina, citrulina, prolina, hidroxiprolina y, probablemente, la lisina.

c) En algunos casos, los menos, la demolición oxidativa de los aminoácidos se inicia por una descarboxilación con las aminoácido-descarboxilasas. Cuando así sucede, las aminas y diaminas que quedan libres se oxidan por las aminoxidasas y las diaminoxidasas, respectivamente, y se producen aldehidos.

A esta forma de oxidación se refiere la que experimenta la l-(—) histidina. Mediante la *histidasa*, que se encuentra en el hígado, se descarboxila y pasa a histamina (375 y 376), que una diaminoxidasa, la *histaminasa*, oxida seguidamente.

De modo análogo, la l-dopa-descarboxilasa (377) descarboxila a la *dopa* y la convierte en hidroxitiramina; y este aminofenol se oxida después en el aldehido correspondiente por la intervención de la aminoxidasa.

LA OXIDACION EN LOS VEGETALES

La respiración celular de los vegetales ofrece notorias analogías con la respiración celular de los animales (378). Una y otra requieren: oxidasas activadoras de oxígeno, dehidrasas que arranquen hidrógeno al substrato y transportadores que pongan en relación ambos elementos.

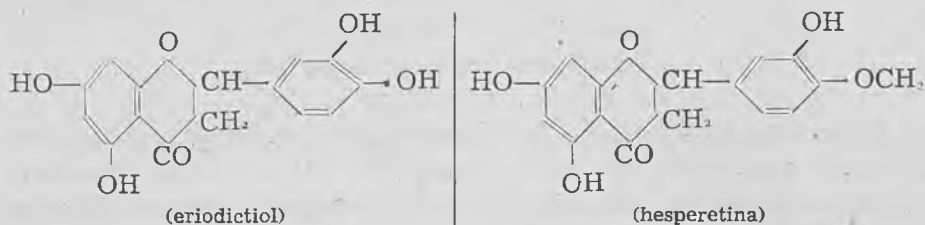
Un buen número de deshidrogenasas se han caracterizado en las plantas; citemos entre ellas, como más frecuentes, la isocítrico-, málico-, succínico-, glutámico-, láctico-, glicerofosfórico-, glucosa-, alcohol-, fórmico- y oxálicodeshidrogenasas; todas requieren coenzima I.

Como activadores de oxígeno se comportan las polifenoloxidasas (tirosinasa, lacasa, etc.), las peroxidasas y, en menor escala, la citocromoxidasa. Polifenoloxidasas y peroxidasas constituyen la parte activa en los sistemas de oxidación de vegetales. A la citocromoxidasa se le atribuye papel secundario, aunque sea posible caracterizarla en muchas plantas, y se haya preparado a partir de embriones de trigo.

Los ácidos dicarboxílicos C, apenas si actúan como transportadores de hidrógeno en la respiración de los tejidos vegetales. Suelen hallarse en las plantas superiores conjuntamente con ácidos cítrico e isocítrico, y aunque tampoco faltan la málico-, succínico- e isocítricodehidrogenasas. ni la fumarasa y aconitasa, es opinión general que los referidos ácidos no intervienen en el ciclo de Krebs ni en el de Szent-Györgyi más que en muy pequeña escala. En cambio, desempeña papel señaladísimo el ácido ascórbico y la ascórbicoxidasa.

Reemplazando al citocromo, que por su escasa frecuencia apenas interviene, los o-difenoles, en conexión directa con las oxidadas, actúan de transportadores electrónicos. Transportadores electrónicos son, en efecto, los difenoles *orto*, en particular la pirocatequina, la 3-4-dihidroxifenilamina (*dopa*) y algunas flavanonas con dos funciones fenólicas en posición *orto* (*vitamina P*). Unos y otros transfieren hidrógeno y se convierten en o-quinonas con cambio de su estructura electrónica.

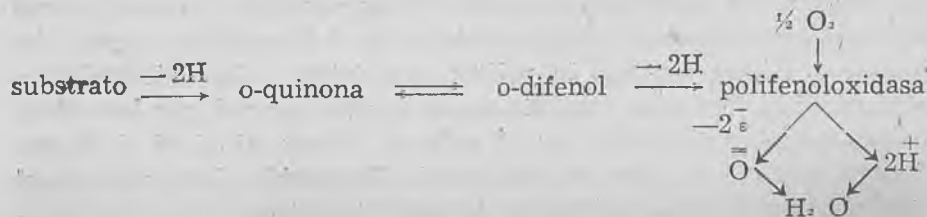
La *vitamina P* o *citrina* es, según Huszak, cien veces más activa que la pirocatequina. De los glucósidos que la componen, la *hesperidina* y la *eriodictina*, el transporte de hidrógeno lo efectúa el último, porque sólo él tiene como aglicón un difenol, el *eriodictiol*; el aglicón de la hesperidina, o *hesperetina*, es inactivo, ya que a uno de sus grupos fenólicos lo eterifica el radical metilo. Ambos responden a las fórmulas



La *vitamina P* es un transportador de hidrógeno análogo a las codehidrasas I y II; en los tres hay una molécula de azúcar enlazada a una vitamina; el azúcar de la eriodictina es la ramnosa, y el de las codehidrasas la d-ribosa.

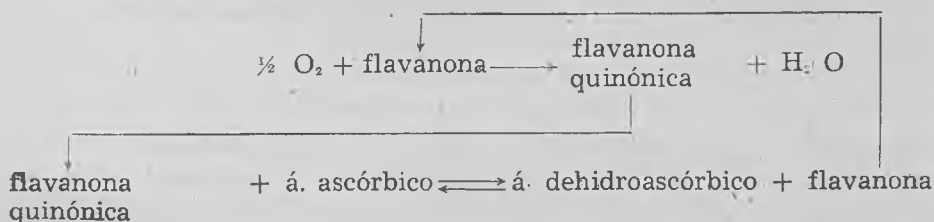
También las antocianinas se comportan como transportadores de hidrógeno en las plantas superiores (Reichel y Burkart). Pero, en este caso, la actividad no la determinan los grupos fenólicos, sino el oxígeno piránico, que en la hidrogenación pierde su carácter de sal de oxonio y pasa de tetra- a divalente (Kuhn y Winterstein).

a) Cuando el activador de oxígeno es una polifenoloxidasas, el esquema de oxidación del substrato en el caso más sencillo es el siguiente:

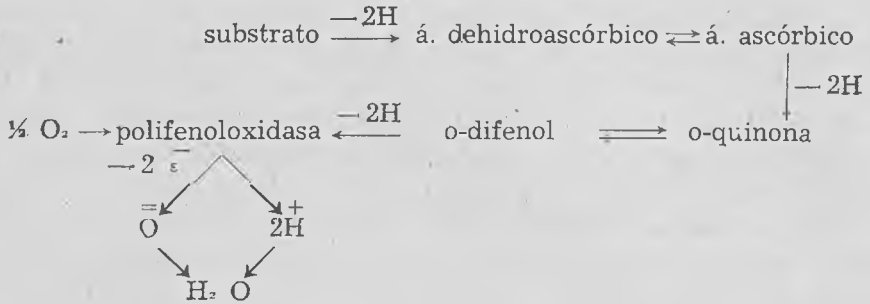


en la que el o-difenol representa a la pirocatequina, a la 3-4-dihidroxifenilalanina o a una flavona. Oxidaciones de esta índole tienen lugar en los tejidos y frutos que se ennegrecen en corte reciente (patatas, manzanas, hongos, etc.). El ennegrecimiento se debe a una interrupción que se produce en la cadena de respiración, en el lugar del corte; a consecuencia de ello, la o-quinona no se reduce a difenol, sino que se oxida a hidroxiquinona y después se polimeriza en productos melanínicos. A juicio de Huszak, muchos colores pardos, rojos y violetas de los vegetales podrían originarse en la oxidación y polimerización de flavanonas y flavonas.

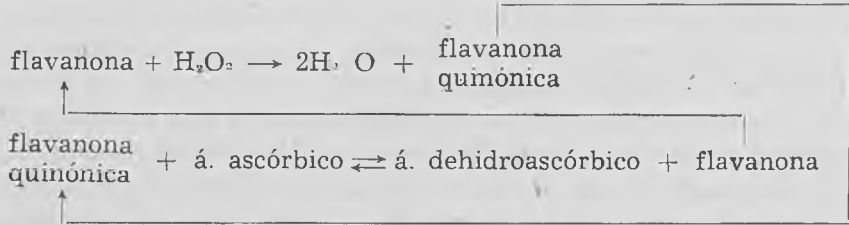
Acontece con frecuencia que entre el substrato y el aceptor quinónico se interpone un transportador activo, por ejemplo, el ácido ascórbico. En ese caso, el tejido o el fruto no se ennegrece al hacerle un corte, ya que no tiene lugar la oxidación y polimerización de la quinona; así ocurre en la naranja, limón y otros frutos ricos en vitamina C. A veces, tampoco hay ennegrecimiento en casos en que el tejido es rico en tirosinasa y tirosina, pues en presencia de ácido ascórbico, sólo una ínfima parte de la tirosina se oxida a 3-4-dihidroxifenilalanina. Esta pequeña cantidad de difenol se comporta como transportador, e impide que mientras haya de él se oxiden nuevas cantidades de tirosina; durante ese tiempo, la tirosinasa emplea su actividad en la oxidación de la hidroxitirosina exclusivamente. Por tanto, la tirosinasa se comporta como un fermento respiratorio, ya que a su actividad de monofenolasa une la de polifenoloxidasa (379). En el proceso, la tirosina sirve de material de reserva para la producción de la *dopa* necesaria al transporte de hidrógeno. El esquema de la respiración celular con polifenoloxidasas y ácido ascórbico es como sigue:



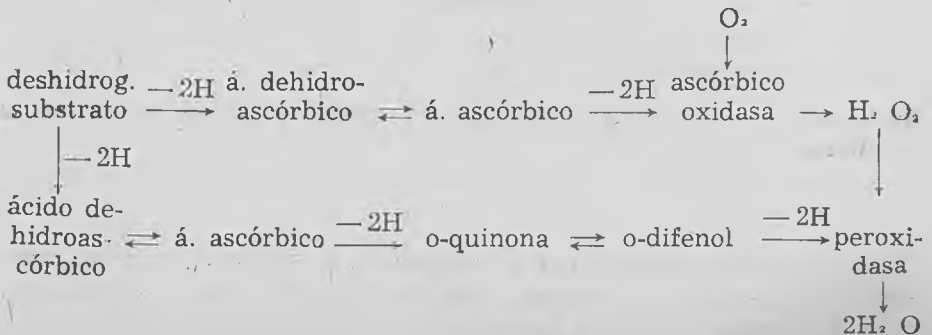
El ácido dehidroascórbico que se origina en la segunda reacción, regenera ácido ascórbico a expensas del substrato. Por tanto, el esquema total de oxidación sería el siguiente:



b) En ocasiones, las peroxidasa juegan papel primordial en la respiración celular de los vegetales, pues en conexión con el sistema ácido ascórbico-ascórbicoxidasa queman una buena parte del substrato. En este caso, tampoco hay ennegrecimiento del tejido cuando se interrumpe la cadena de oxidación por un corte, ya que el ácido ascórbico impide la formación de melaninas. Las reacciones que tienen lugar son las que indica el adjunto esquema (380 y 381).



El oxígeno oxida dos moléculas de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, con formación intermedia de agua oxigenada, que la peroxidasa descompone. El ácido dehidroascórbico regenera ácido ascórbico a expensas del sistema substrato-dehidrasa. El esquema total se indica así:



Unos y otros esquemas muestran que fundamentalmente no hay diferencia entre los procesos de oxidación en tejidos vegetales y animales. Para la respiración de las células y tejidos animales hace falta

substrato \rightarrow dehidrasa \rightarrow transportador \rightarrow citocromo \rightarrow citocromo-oxidasa \rightarrow O₂

análogamente, la respiración de células y tejidos vegetales precisa de

substrato \rightarrow dehidrasa \rightarrow transportador \rightarrow polifenol \rightarrow polifenol oxidasa \rightarrow O₂

Las piezas del mecanismo respiratorio en ambos esquemas son las mismas o análogas; la diferencia estriba en que en las plantas las polifenoloxidasas reemplazan a la citocromoxidasa de tejidos animales, y los difenoles a los citocromos. En los vegetales, el fermento metálico es una cuproproteína y en los animales un hemocromógeno: es decir, en los vegetales el cobre reemplaza al hierro.

LA ENERGIA DE LAS REACCIONES DE OXIDACION

La energía necesaria para el mantenimiento de la actividad celular procede de los alimentos. De ellos la liberan las células al desdoblarlos en moléculas más pequeñas y quemarlos; esto es, en las reacciones de fermentación y en las de respiración celular.

Fermentación y respiración celular tienen naturaleza análoga; ambas se realizan mediante óxido-reducciones acopladas a reacciones de fosforilación. Pero la fermentación representa un fenómeno sencillo, tan sencillo como antieconómico, ya que la mayor parte de la energía química del substrato queda retenida en las moléculas del producto de fermentación (alcohol, ácido láctico, etc.); además, suele ser característica de organismos inferiores. Cuando la complejidad orgánica crece y las necesidades energéticas aumentan, el oxígeno del aire interviene, y la respiración celular aparece, efectuándose con mecanismos tanto más complicados cuanto más elevada es la posición del ser vivo en la escala vegetal o animal. Con ello la célula no pierde su capacidad fermentativa, y en estos organismos producen reacciones de fermentación

junto a oxidaciones aerobias. Células aerobias, en ausencia de aire, desdoblan los hidratos de carbono en ácido láctico o alcohol; y en presencia de él consumen oxígeno y respiran desprendiendo gas carbónico. Una interdependencia se establece entre ambos fenómenos y de ella nace la *reacción Pasteur*.

Si la energía que queda libre en las reacciones de fermentación y de respiración celular se desprendiera total y rápidamente en forma de calor, las células no la aprovecharían, porque son incapaces de utilizar energía térmica para producir trabajo. La energía de oxidación ha de liberarse de modo que sea útil a las funciones celulares: como energía mecánica, capaz de producir trabajo en la glucólisis del músculo; como energía química, utilizable en los fenómenos de síntesis del organismo; en forma de luz fría o quimioluminiscencia, en radiolarios, crustáceos, insectos, etc.; y como energía eléctrica en los órganos de defensa de ciertos peces. Tan sólo les es permitido que una pequeña parte se disipe en forma de calor, y esto en la medida necesaria para mantener constante la temperatura del organismo y atender a otras reacciones químicas de naturaleza endotérmica.

Esa energía no se libera al arrancar hidrógeno al substrato, sino al quemarlo con oxígeno o al fijarlo a algún metabolito; por eso, Szent-Györgyi pudo exclamar con cierta razón que «el gran combustible del mundo viviente es el hidrógeno y no el carbono». Ni queda en libertad brusca, sino gradualmente, a medida que el hidrógeno relaja su enlace electrónico y pasa de puente en puente a través de los transportadores; porque su oxidación comienza en el momento en que el primer aceptor lo toma del substrato y lo fija a su molécula, y no termina hasta unirse definitivamente con el oxígeno activado. La oxidación aerobia, la más interesante desde el punto de vista energético, se desenvuelve en los tejidos animales a través de una cadena de transportadores que transfieren el hidrógeno hasta volcarlo en el sistema citocrómico: *punte estrecho*, como lo llama Szent-Györgyi, por el que únicamente circulan electrones totalmente desligados de los iones H^+ . En cada paso a través de los transportadores vase liberando energía por pequeñas porciones, pues los sistemas de óxido-reducción así intercalados entre substrato y oxígeno molecular actúan de reguladores, como regulan el desagüe de un pantano las compuertas de su presa.

La fracción de energía liberada en cada peldaño es proporcional a la diferencia existente entre los potenciales de los dos sistemas de oxidación y reducción consecutivos por los que salta el hidrógeno; de aquí que el sistema citocrómico deje en libertad alrededor de los 2/3 de la total energía de oxidación del substrato.

Si la oxidación se realizara de una vez, las 68 Kcal. que se desprenden en la combustión de cada mol. de hidrógeno se disiparían en forma de calor, porque la reacción es rápida, y las células no están dispuestas al modo de una máquina térmica para transformar bruscamente el calor en trabajo. Habían de estarlo, y aun así trabajarían en régimen deficitario, en atención al escaso rendimiento de aquellos mecanismos. En cambio, fragmentando la oxidación en numerosas reacciones, las células aprovechan mejor las fracciones de energía que quedan libres en cada uno de los procesos parciales, e incluso almacenan la sobrante para utilizarla en momento y lugar oportuno.

Téngase presente que una mol. de glucosa desprende en la combustión completa 675 Kcal., a las que hay que añadir otras 12 Kcal., correspondientes al cambio de entropía $T \times \Delta S$. Interesa mucho que esta energía no se disipe en forma de calor, como ocurriría si la oxidación se verificara de una vez. Afortunadamente, las células disponen de medios para retener el sobrante energético, y algunas de las reacciones que en ellas tienen lugar, son de tal naturaleza que se aproximan a las de carácter isoterma y reversible que aconseja la Termodinámica para obtener el máximo trabajo exterior.

Lipmann y Ochoa, entre otros, demuestran que la mayoría de las deshidrogenaciones se efectúan en procesos acoplados con la fosforilación, lo que a juicio de Krebs tiene por finalidad aprovechar la energía de oxidación del substrato para aplicarla a otras reacciones. Esta energía procede de las moléculas del alimento, y su liberación exige un cambio estructural previo, conducente a una nueva distribución de la energía interna de aquél, de modo que permita concentrarla en los enlaces fosfáticos. Cuando el aldehído 1-3-difosfoglicérico se oxida a ácido-1-3-difosfoglicérico, la deshidrogenación va acompañada de cambio en la estructura, por virtud del cual el enlace pobre en energía del radical $-\text{PO}(\text{OH})_2$ que está unido al grupo hidrato de aldehído, se transforma en otro de alto contenido energético $\text{P}=\text{O}(\text{OH})_2$; cosa parecida ocurre también al ácido-2-fosfoglicérico cuando en la deshidratación se convierte en ácido-2-fosfopirúvico.

Con esa energía se reconstruye la molécula de ATP a partir de la de ADP, y el éster fosfórico crea en ella un nuevo enlace fosfático cuyo contenido energético importa alrededor de 12 Kcal./mol. Después, en la fosforilación, la ATP transfiere a otras moléculas el radical $\text{P}=\text{O}(\text{OH})_2$ y con él, muchas veces, la energía química de su enlace, que pasa íntegra a la nueva molécula sin disiparse en lo más mínimo en forma de calor. Todos los compuestos con enlaces fosfáticos de alto contenido energético pueden transferir *reversiblemente* ra-

dicales fosfóricos a la ADP para regenerar ATP, que es el manantial más precioso de energía de que dispone la síntesis.

Por el contrario, en aquellas transfosforilaciones en que el enlace fosfático pierde su carácter de alto contenido energético, una buena parte de la energía química se transforma en calor, trabajo, etc.; así sucede en la fosforilación de los grupos oxhídricos de las hexosas y glicerina por aquellos ésteres, y muy particularmente en su misma hidrólisis. Estas últimas reacciones son irreversibles, como corresponde a su fuerte carácter exotérmico, y su energía es la propia energía de oxidación convenientemente represada en los componentes de las mismas. A tales efectos sépase que mientras los fosfatos resultantes de la esterificación de grupos alcohólicos (hexosa-fosfato, triosa-fosfato, glicerofosfato, ácido-3-fosfoglicérico y ácido-2-fosfoglicérico) desprenden en la hidrólisis de 2.000 a 4.000 calorías, importa de 10.000 a 12.000 calorías la energía que se desprende en la hidrólisis de los ésteres fosfóricos, cuyo radical —PO(OH)_2 esterifica a otro residuo de fosfato, a un carboxilo, a un grupo enol o a un residuo de guanidina. La gran dificultad estriba en averiguar cómo el organismo dirige y regula estas reacciones irreversibles y aprovecha su energía de modo que le sea útil.

La fosforilación constituye uno de los más finos y sutiles mecanismos que poseen las células para retener la energía que queda libre durante su actividad funcional; son muchos los ésteres fosfóricos que obran cual si fueran «paquetes de energía», a través de los cuales circula ésta hasta llegar al lugar en que haya de utilizarse, sea para la síntesis de glucógeno, sea para producir trabajo mecánico con auxilio de la miosina o proteína contráctil del músculo.

Por esta razón, la adenosina-difosfato y la adenosina-trifosfato, el ácido acetilfosfórico y, en general, los acilfosfatos, el fosfoenolpiruvato y el fosfoenoloxalacetato, el ácido-1-3-difosfoglicérico y, sobre todo, el fosfágeno, constituyen los más valiosos artefactos que las células tienen a disposición para represar la energía que se desprende en los procesos de oxidación y utilizarla en los de síntesis. La del glucógeno acontece en presencia de oxígeno, con la intervención de aquellos ésteres y a expensas de su energía, en un proceso similar al que desarrolla la clorofila de los vegetales para sintetizar el almidón con el concurso de la energía radiante.

Durante la glucólisis del músculo, por cada seis átomos de carbono de la cadena del glucógeno, una mol. de ATP se consume para fosforilar la hexosa-6-fosfato en hexosa-1-6-difosfato; pero, a la vez, otras cuatro se producen en la desfosforilación del ácido-1-3-difosfoglicérico y del ácido-2-fosfopirúvico resultantes en el proceso.

Por consiguiente, en la transformación de glucógeno en ácido láctico hay ganancia de tres mol. de ATP por cada seis carbonos del carbohidrato que se metaboliza. En este proceso la energía interna del sistema disminuye en 57 Kcal.; 30 de ellas quedan retenidas en el enlace fosfático terminal de las tres moléculas de adenosina-trifosfato formadas, o en el fosfágeno que se produce mediante la reacción de Lohmann



y el resto se disipa como energía calorífica o invierte en otras reacciones. Ahora bien, las 30 Kcal. retenidas por las tres mol. de ATP se aprovechan lenta pero íntegramente para realizar trabajo mecánico; porque la ATP se hidroliza irreversiblemente por la adenosinatrifosfatasa, y la energía de reacción se emplea en provocar la contracción súbita de las moléculas de miosina. Así, el 52 %, al menos, de la energía liberada durante la glucólisis del músculo se aprovecha como trabajo útil. Es de presumir que tal rendimiento, muy superior al de cualquier máquina térmica, en las que apenas se logran efectos útiles del orden del 20-25 %, alcance valores aún más elevados si en lugar de referirnos únicamente a la fase anaerobia del proceso de demolición del glucógeno, tomamos en cuenta la fase aerobia del mismo, o sea la que corresponde a la oxidación total del piruvato, en la que otras reacciones de fosforilación se suceden.

Por eso, comentando la economía con que el organismo procede para gastar sus reservas energéticas, Szent-Györgyi decía en la solemne sesión celebrada en 1937, con motivo de serle otorgado el Premio Nóbel de Química: «La célula gasta calderilla para atender a sus necesidades.» Quizás la frase parezca vulgar a muchos; sin embargo, expresa de modo bien gráfico la economía con que proceden las células en la administración de su caudal. ¡Lástima que su comportamiento no sirva en todo tiempo de norma a los hombres, y más en esta época en que las rivalidades humanas dejaron exhausto el mundo!

Pocas cosas hay más admirables que los mecanismos con que el Creador dotó a la vida para proveerla de energía. Entre los que utilizan los cloroplastos con el fin de aprovechar y almacenar la que el sol irradia, y los sutiles y delicados de que se valen los vegetales y animales para arrancarla de alimentos y materiales de reserva en los procesos de oxidación y reducción, un tupido y complicado engranaje de reacciones se establece en régimen de completa y absoluta solidaridad. Sus impulsores y mantenedores suelen ser los componentes más

escasos del organismo: las vitaminas, los fermentos y las hormonas. A ellos, por sus cualidades, se les dió la función rectora; quizás, sin ellos, no sería utilizable la energía almacenada en la masa de materiales de cada ser, ni posible la vida. Bien puede afirmarse que los sistemas de oxidación y reducción son componentes selectos de todo organismo viviente; porque haciendo honor a la función que tienen asignada, rigen la vida y administran su riqueza energética con economía ejemplar.

Medite cada uno en la responsabilidad en que incurre, si estando en posesión de tan celosos administradores derrocha vanamente la energía que éstos le suministran. Y sepa que en obligada correspondencia de amor y gratitud hacia Aquél que con tan delicados medios nos dotó, debemos cuidar que nuestras actividades se dirijan íntegramente al servicio del Bien, que es decir de la Patria, de la Humanidad y de Dios.

He dicho.

BIBLIOGRAFIA

LIBROS Y MONOGRAFÍAS

- ABDERHALDEN, E.—*Vitamine, hormone, fermente.*—Ed. Urban & Schwarzenberg.—Berlin y Viena, 1943.
- BALDWIN, E.—*Dinamic Aspects of Biochemistry.*—Cambridge University, 3, 1947.
- BALL, E. G.—*Oxidation mechanismus in animal tissues. (A Symposium on Respiratory Enzymes.)*—Univ. Wisconsin Press, 1942.
- BERSIN, TH.—*Kurzes Lehrbuch der Enzymologie.* Segunda ed. Leipzig, 1939.
- BIGWOOD.—*Le Mecanisme des reactions d'oxydation dans les organismes vivants.*—Masson & Cie.—París, 1939.
- BLADERGROEN, W.—*La Físico-Química en la Medicina y en la Biología.*—Ed. Espasa Calpe.—Madrid, 1946.
- BOULANGER, P.—*La vitamine P.*—Ed. Masson.—París, 1944.
- COHEN, P. F.—*Transamination. (A Symposium on Respiratory Enzymes.)*—Univ. Wisconsin Press, 1942.
- CORI, C. F.—*Phosphorylation of Carbohydrates. (A Symposium on Respiratory Enzymes.)*—Univ. Wisconsin Press, 1942.
- DEULOFEU, V.—*Curso de Química biológica.*—Ed. «El Ateneo».—Buenos Aires, 1942.
- DOUGLAS, C. HARRISON, SHEFFIELD.—*The dehydrogenases of Animal Tissues.*—Ergeb. d. Enzymforschung. Bd. IV, Akad. Verlags. Leipzig, 1935.
- ELLIOT, K. A. C.—*Biological Oxidation-Reduction. Catalyst.*—Schwab. G. M. Handbuch der Katalyse. Bd. III. Biokatalyse. Springer. Verlag.—Viena, 1941.
- ELLIOT, K. A. C.—*Biological Oxidations and Reductions.* Ann. Review of Biochemistry.—Vol XV, 1946.
- EVANS, E. A.—*Metabolic Cycles and Descarboxylation. (A Symposium on Respiratory Enzymes.)*—Univ. Wisconsin Press, 1942.
- FRANKE, W.—*H. Wielands Arbeiten zum Mechanismus der Biologischen. Oxydation.* Naturwiss. 30, 342, 351 (1942).
- GIUA, M.—*La Chimica de la vita organica.*—Torino, 1946.
- GUZMÁN BARRÓN, E. S.—*Cellular Oxidation Systems.*—Chicago, 1939.
- GUZMÁN BARRÓN, E. S.—*Biological Oxidations and Reductions.*—Chicago, 1941.
- GUZMÁN BARRÓN, E. S.—*Mechanisms of Carbohydrate metabolism.*—An. Essay on comparative Biochemistry. Advances in Enzymology, vol. III, 1943.
- HOGNES, T. R.—*The Flavoproteins. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942).*
- JAMES, V. O.—*The Respiration of Plants.*—Ann. Rev. of Biochemistry, vol XV, 1946.
- KALCKAR H. M.—*Discussion on Phosphorilation. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942).*

- KEITA, SHIBATA.—*Cytochrom und Zellatmung*.—Ergeb. Enzymforschung, 1935
- KREBS, H.A.—*The intermediary Stages in the Biological Oxidation of carbohydrate*. (Advances in Enzymology.) Vol. III, 1943.
- LANGENBECK, W.—*Lehrbuch der organischen Chemie*.—4.^a ed., Dresden y Leipzig, 1943.
- LARDY, H. A. & ELVEHJEM, C. A.—*Biological Oxidations and Reductions*.—Ann. Rev. of Biochemistry. Vol. XIV, 1945.
- LEHNARTZ, E.—*Chemische Physiologie*.—6.^a ed. Springer Verlag. Berlin, 1943.
- LEIBOWITZ & HESTRIN.—*Alcoholic Fermentation of the Oligosacharides*. Advances in Enzymology. Vol. V., 1945, Nueva York.
- LORA TAMAYO, M.—*Modernas orientaciones en Química de enzimas*.—Ed. «Saeta». Madrid, 1942.
- MEYERHOF, O.—*Intermediate Carbohydrate Metabolism*. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942).
- MICHAELIS, L.—*Oxidation-Reductions Potentiale*. Springer Verlag, Berlin, 1933.
- NELSON, J. M. & DAWSON, R.—*Tyrosinase*. Advances in Enzymology, vol. IV, 1944, Nueva York.
- POLONOWSKI, M.—*Constitution chimique des diastases*. Masson. Ed., París, 1939.
- POLONOWSKI, M.—*Glycolyse et respiration*. Masson Ed. 1944, París.
- POTTER, R. VAN.—*Discussion on Hydrogen Transport*. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942.)
- SANTOS RUIZ, A.—*Fermentos*.—Ed. «Saeta».—Madrid, 1944.
- SCHLENK, F.—*Enzymatic Reactions involving Nicotinamide and its related Compounds*. Advances in Enzymology. Vol. V, 1945, Nueva York.
- SCHLENK, F.—*Nicotinamide Nucleotide Enzymes*. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942.)
- STERN K. G.—*Oxidases, Peroxidases and Catalases*. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Pres, 1942.)
- STOTZ, E.—*Cytochromes*. (A Symposium on Respiratory Enzymes. Univ. Wisconsin Press, 1942.)
- SUMNER, J. B. & SOMERS, S. F.—*Chemistry and Methods of Enzymes*. Ac. Press. Inc. Publ. Nueva York, 1945.
- SZENT-GYORGYI, A.—*Les oxidations biologiques au niveau cellulaire*. Masson Ed. París, 1939.
- WERKMAN, C. H. & WOOD, H. G.—*Advances in Enzymology*, Vol. II, 1942 Nueva York.
- WURMSER, R.—*Les potentiels d'oxydo-reduction des Systèmes biologiques*. (Exposes Annuels de Biochimie Medicale).—Masson Ed. París, 1939.
- ZEILER, K.—*Über Cytochrom*. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 76. A. 99, 115, 1943.

NOTAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.—WARBURG, O.—Naturwissenschaften, 16, 345, 856 (1928)
- 2.—WARBURG, O.—Z. Angew. Chem. 41, 1 (1932).
- 3.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. 106, 418 (1930).
- 4.—KUHN, R.—Hoppe Seylers Z. 201, 255 (1936).
- 5.—ZEILE, K.—Hoppe Seylers Z. 192, 171 (1930); 195, 35 (1931).
- 6.—RICHTER, D.—Biochem. J. 28, 901 (1934).
- 7.—KUBOWITZ F.—Biochem. Z. 292, 221 (1937) y 299, 32 (1938).
- 8.—MICHAELIS, L.—J. Biol. Chem. 91, 355 (1931).
- 9.—HABER, F. y WILLSTATER, R.—Ber. deutsch. Chem. Ges. 64, 2.844 (1931).
- 10.—CLARK, V. M. y COHEN, B.—Pub. Health, Repts. 38, 606 (1923).
- 11.—ROHRMANN, F. y SPITZER, W.—Ber. deutsch Chem. Ges. 28, 567 (1895)
- 12.—POHL, J.—Arch. exptl. Patol. Pharmacol. 38, 65 (1897).

- 13.—KEILIN, D.—*Ergeb. Enzymforsch.* **2**, 239 (1933).
- 14.—STOTZ, E. SEIDWELL, A. E. y HOGNESS, T. R.—*J. Biol. Chem.* **124**, 733 (1938).
- 15.—KEILIN, D. y HARTREE, F.—*Proc. Roy. Soc. (Londres). B.* **125**, 171 (1938).
- 16.—STOTZ, E.—*J. Biol. Chem.* **124**, 733 (1938).
- 17.—WARBURG, O. y NEGELEIN, E.—*Biochem. Z.* **262**, 237 (1933).
- 18.—KEILIN, D.—*Nature (Londres)*. **132**, 783 (1933); **133**, 290 (1934) y **141**, 840 (1938).
- 19.—CONNANT, J. B., ALLES, G. A. y TONBERG, C. O.—*J. Biol. Chem.* **79**, 89 (1928).
- 20.—RICHTER, D.—*Biochem. J.* **28**, 901 (1934).
- 21.—RAPER, H. S.—*Ergeb. Enzymforschung.* **1**, 270 (1932).
- 22.—KUBOWITZ, F.—*Biochem. Z.* **292**, 221 (1937) y **299**, 32 (1938).
- 23.—KEILIN, D. y MANN, T.—*Proc. Roy. Soc. (Londres) B.* **125**, 187 (1938).
- 24.—DAWSON, C. R. y LUDWIG, B. J.—*J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1617 (1938).
- 25.—BERTRAND, G.—*Compt. Rend.* **121**, 166 (1895).
- 26.—BOURQUELOT, E. y BERTRAND, G.—*Compt. Rend. Soc. biol.* **47**, 582 (1895).
- 27.—ROBINSON, E. S. y NELSON, J. M.—*Arch. biochem.* **4**, 111 (1944).
- 28.—WALKER, E. M. y NELSON, J. M.—*Arch. biochem.* **7**, 111 (1944).
- 29.—RAPER, S. M.—*Ergeb. Enzymforschung.* **1**, 270 (1932).
- 30.—KUBOWITZ, F.—*Biochem. Z.* **299**, 221 (1937); **296**, 442 y
- 31.—KEILIN, D. y MANN, T.—*Proc. Roy. Soc. (Londres). B.* **125**, 187 (1938).
- 32.—DALTON, H. R. y NELSON, J. M.—*J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2946 (1939).
- 33.—OMLOW y ROBINSON, E. S.—*Biochem. J.* **22**, 1327 (1928).
- 34.—NELSON, J. M. y DAWSON, C. E.—*Advances in Enzymology.* **4**, 149 (1944).
- 35.—YOSHIDA, H.—*J. Chem. Soc.* **43**, 472 (1883).
- 36.—KEILIN, D. y MANN, T.—*Nature.* **143**, 23 (1939); **145**, 304 (1940).
- 37.—BERTRAND, D.—*Bull. Soc. Chim. biol.* **26**, 40 (1944).
- 38.—BLOCH, B.—*Z. physiol. Chem.* **98**, 228 (1927).
- 39.—ARNOW, L. E.—*J. Biol. Chem.* **120**, 151 (1937).
- 40.—HUSZAK, ST.—*Z. physiol. Chem.* **90**, 385 (1938).
- 41.—KEILIN, D. y HARTREE, E. F.—*Proc. Roy. Soc. (Londres) B.* **125**, 187 (1938).
- 42.—SZENT-GYORGYI, A.—*Sciencie.* **72**, 125 (1930).
- 43.—TAUBER, H. y KLEINER, I. S.—*J. Biol. Chem.* **110**, 211 (1935).
- 44.—TADOKORO, T. y TAKASUGUI, N.—*J. Chem. Soc. Japan.* **60**, 188 (1939).
- 45.—LOVETT-JANISON, P. L. y NILSSON, R.—*J. of Am. Chem. Soc.* **62**, 1407 (1940).
- 46.—SZENT-GYORGYI, A.—*J. biochemistry*, **90**, 385 (1938).
- 47.—HOPKINS, R. H. y MORGAN, E. J.—*Biochem. J.* **30**, 1446 (1936).
- 48.—BLANCH, M. B. y HOCH, F. C.—*Biochem. J.* **36**, 252 (1942).
- 49.—WIECHOWSKI, W.—*Biochem. Z.* **19**, 366 (1909) y **25**, 431 (1910).
- 50.—KEILIN, D., HARTREE, E. F. y BRUNNING.—*Proc. Roy. Soc. Londres. B.* **119**, 114 (1935).
- 51.—HOLMBERG, C. G.—*Biochem. J.* **33**, 1901 (1939).
- 52.—DAWIDSON, F. N.—*Biochem. J.* **32**, 1386 (1938).
- 53.—HAUGE, S. M.—*J. Biochem.* **108**, 331 (1935).
- 54.—SUMNER, J. B. y SUMNER, R. J.—*J. Biol. Chem.* **134**, 531 (1940).
- 55.—HUMMEL, J. P. y MATTILL, H. A.—*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **55**, 31 (1944).
- 56.—THUNBERG, T.—*Biochem. J.* **19**, 175 (1925).
- 57.—ELLIOT, L.—*Biochem. J.* **26**, 10 (1932).
- 58.—KEILIN, D. y MANN, T.—*Proc. Roy. Soc. (Londres) B.* **122**, 119 (1937).
- 59.—SZENT-GYORGYI, A.—*Biochem. J.* **22**, 1387 (1928).
- 60.—GUZMÁN BARRÓN, E. S.—*Physiol. Rev.* **19**, 184 (1939).
- 61.—SWEDIN, B. y THEORELL, H.—*Nature*, **145**, 71 (1940).
- 62.—SUMNER, J. B. y DOUNCE, A. L.—*J. Biol. Chem.* **121**, 417 (1937) y **127**, 439 (1939).
- 63.—LASKOWSKI, M. y SUMNER, J. B.—*Sciencie*, **94**, 615 (1941).
- 64.—ZEILE, K. y HELLSTROM, H.—*Z. physiol. Chem.* **192**, 171 (1930) y **195**, 39 (1931).
- 65.—STERN, K. G.—*J. Biol. Chem.* **112**, 661 (1939).
- 66.—STERN, K. G. y WYCKOFF.—*J. Biol.* **124**, 573 (1938).

- 67.—KEILIN, D. y HARTREE, E. F.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **124**, 397 (1938).
- 68.—HALDANE, J. D. F.—Proc. Roy. Soc. (Londres) B., **108**, 559 (1931).
- 69.—BARRÓN GUZMÁN, E. S.—Physiol. Rev. **19**, 184 (1939).
- 70.—HOPKINS, R. H. y MORGAN, E. J.—Biochem. J. **32**, 611 (1938).
- 71.—HOPKINS, R. H. y MORGAN, E. J.—Biochem. J. **32**, 611 (1938).
- 72.—RAPKINE, L.—Biochem. J. **32**, 1729 (1938).
- 73.—EULER, H. VON y ADLER, E.—Z. physiol. Chem., **232**, 10 (1935).
- 74.—GUZMÁN BARRÓN y SUNYER.—J. Biochem, **157**, 22 (1944).
- 75.—GUZMÁN BARRÓN, E. S. y SUNYER.—Science, **97**, 356 (1943).
- 76.—STERN, K. J. y MELNICK, J. L.—Nature, **144**, 330 (1939).
- 77.—BREUSCH, F. L.—Biochem. Z. **295**, 101 (1938).
- 78.—GREEN, D. E. y OGSTON, F. J.—Biochem. J. **29**, 1973 (1935).
- 79.—ELVEHJEM, C. A.—J. Biol. Chem. **142**, 85 (1942).
- 80.—FISCHER, F. J.—Ann. **552**, 203 (1942).
- 81.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **104**, 206 (1929).
- 82.—STOTZ, E. y HASTINGS, A. B.—J. Biol. Chem. **118**, 479 (1937).
- 83.—HOPKINS, R. H.—Nature. **143**, 554 (1934).
- 84.—KEILIN, D. y HARTREE, E. F.—Proc. Roy. Soc. (Londres). D. **129**, 277 (1940).
- 85.—STRAUB, F. B.—Z. physiol. Chem. **272**, 19 (1942).
- 86.—DEWAN, J. G. y GREEN, D. E.—Biochem. J. **31**, 1074 (1937).
- 87.—LAKI, K.—Z. physiol. Chem. **225**, 57 (1934).
- 88.—LEHMANN, J.—Skand arch. Physiol. **58**, 173 (1929-1930).
- 89.—BERNHEIM, F.—Biochem. J. **22**, 1178 (1928).
- 90.—STEPHENSON, F.—Biochem. J. **22**, 605 (1928).
- 91.—DIXON, M. BACH, S. J., y ZERFAS, L. J.—Nature, **149**, 48 (1942).
- 92.—GREEN, D. E.—Biochem. J. **30**, 629 (1936).
- 93.—SCHARDINGER, F.—Z. Unters. Lebensmittel. **5**, 1113 (1902).
- 94.—MORGAN, E. J. STEWART, C. P. y HOPKINS, F. G.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **94**, 109 (1922-23).
- 95.—DIXON, M. y THURLOWS.—Biochem. J. **18**, 971 (1924).
- 96.—BOOTH, W. H.—Biochem. J. **32**, 494 (1938).
- 97.—BALL, E. G.—J. Biol. Chem. **128**, 51 (1939).
- 98.—GREEN, D. E.—Biochem. J. **28**, 1550 (1934).
- 99.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **298**, 158 (1938).
- 100.—GORDON, A. H., GREEN, D. E., y SUBRAHMAYAN, V.—Biochem. J. **34**, 764 (1940).
- 101.—KREBS, H. A.—Enzymología, **7**, 53 (1939).
- 102.—STRAUB, F. B.—Nature, **141**, 603 (1938).
- 103.—WARBURG O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **295**, 261;
- 104.—NEGELEIN, E., y BROMEL, H.—Biochem. Z. **300**, 225 (1939).
- 105.—KARRER, P., y FRANK, H.—Helv. Chim. Ac. **23**, 948 (1939).
- 106.—GREEN, D. E.—J. Biol. Chem. **148**, 461 (1943); **155**, 421 (1944).
- 107.—GREEN, D. E. y BLANCHARD, M.—J. Biol. Chem. **161**, 583 (1945).
- 108.—EDELBACHER, S.—Helv. Chem. Ac. **28**, 928 (1945).
- 109.—BRAUNHSTEIN, A. E.—Nature, **143**, 609 (1939).
- 110.—KREBS, H. A. y JOHNSON, W. A.—Biochem. J. **31**, 665 (1937).
- 111.—WULF, H. J.—Biochem. Z. **289**, 437 y **293**, 351 (1937).
- 112.—EULER, H. VON, y ADLER, E.—Z. physiol. Chem. **226**, 196 (1934) y **241**, 239 (1936).
- 113.—WURMSER, R.—J. Chem. physique. **33**, 577 (1936).
- 114.—ADLER, E. SREMISWASAYA, M.—Z. physiol. Chem. **249**, 24 (1937).
- 115.—DAKIN, H. D.—J. Biol. Chem. **8**, 97 (1910).
- 116.—BANGA, I.—Z. physiol. Chem. **217**, 43 (1933).
- 117.—GREEN, D. E., y DEWAN, J. G.—Biochem. J. **31**, 1069 (1937).
- 118.—GREEN, D. E., DEWAN, J. G. y LELOIR, L. F.—Biochem. J. **31**, 934 (1937).
- 119.—SZENT-GYORGYI, A.—Biochem. Z. **157**, 50 (1925).
- 120.—MEYERHOF, O. y LOHMANN, L.—Biochem. Z. **171**, 421 (1926).

- 121.—MEYERHOF, O.—Arch. Ges. physiol. 175, 20 (1919).
- 122.—BOYLAND, E. y BOYLAND, M. E.—Biochem. J. 28, 1417 (1934).
- 123.—STRAUB, F. B.—Biochem. J. 34, 483 (1940).
- 124.—EULER, H. VON, ADLER, E., GÜNTHER, G. y HELLSTROM, H.—Z. physiol. Chem. 245, 217 (1937).
- 125.—SZENT-GYORGYI, A.—Biochem. Z. 217, 51 (1933).
- 126.—GUZMÁN BARRÓN, E. S. y HASTINGS, A. B.—J. Biol. Chem. 107, 567 (1934).
- 127.—GREEN, D. E. y DEWAN, J. G.—Biochem. J. 33, 1069 (1937).
- 128.—THUNBERG, T.—Skand. Arch. physiol. 24, 23 (1910).
- 129.—BATTELLI, F. y STERN, S.—Compt. Rend. Sc. Soc. Biol. 62, II, 552 (1910).
- 130.—STRAUB, F. B.—Z. physiol. Chem. 275, 73 (1942).
- 131.—LAKI, K.—Z. physiol. Chem. 249, 63 (1937).
- 132.—LEHMAN, J.—Skand. Arch. physiol. 82, 113 (1937).
- 133.—ADLER, E. y HUGHES, W.—Z. Physiol. Chem. 242, 215 (1936).
- 134.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. 301, 221 y 303, 40 (1939).
- 135.—NEGELEIN, E. y BROMMEL, H.—Biochem. Z. 303, 132 (1939)
- 136.—MEYERHOF, O. y JUNOWICZ-KOCHOLATY.—J. Biol. Chem. 149, 71 (1943).
- 137.—CAPUTTO, R. y DIXON, N.—Nature. 156, 630 (1945).
- 138.—EULER, H. VON, ADLER, E. y GÜNTHER, G.—Z. physiol. Chem. 249, 1 (1937).
- 139.—MEYERHOF, O. y KIESSLING, W.—Biochem. Z. 266, 40 (1933) y 283, 83 (1935).
- 140.—HARRISON, D. C.—Biochem. J. 25, 1016 (1931) y 26, 1295 (1932).
- 141.—LYNEN, F. y FRANKE, W.—Z. physiol. Chem. 270, 271 (1941).
- 142.—MANN, P. J.—Biochem. J. 26, 785 (1932).
- 143.—ANDERSON, B.—Z. physiol. Chem. 225, 57 (1936).
- 144.—DAS, N.—Proc. Roy. Soc. (Londres) D.113, 150 (1935).
- 145.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. 254, 438 (1932); 266, 377 (1935); 292, 287 (1937).
- 146.—NEGELEIN, E. y GERISCHER, W.—Biochem. Z. 284, 289 (1936).
- 147.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. 238, 131 (1931).
- 148.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Z. physiol. Chem. 226, 196 (1934) 235, 164 (1935); 238, 233 (1936).
- 149.—HAAS, E., HORECKER, B. L. y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. 136, 747 (1940).
- 150.—WARBURG, O.—Biochem. Z. 292, 287 (1937).
- 151.—LIPMANN, F.—Nature. 138, 588 (1936).
- 152.—MARTIUS, C., y KNOOP, F.—Z. physiol. Chem. 246, 1 (1937) y 247, 104 (1937).
- 153.—MARTIUS, C.—Z. physiol. Chem. 257, 29 (1938).
- 154.—JOHNSON, W. A.—Biochem. J. 33, 1046 (1939).
- 155.—BERNHEIM, F.—Biochem. J. 22, 1178 (1928).
- 156.—THUNBERG, T.—Biochem. Z. 206, 109 (1929).
- 157.—ANDERSON, B.—Z. physiol. Chem. 217, 186 (1933).
- 158.—EULER, H. VON, ADLER, E. y GÜNTHER, G.—Biochem. J. 33, 1028 (1939).
- 159.—OCHOA, S.—J. Biol. Chem. 160, 373 (1945).
- 160.—EULER, H. VON.—Z. physiol. Chem. 255, 27 (1938).
- 161.—DOMODORAU, M., y NAIRK, R.—Biochem. J. 32, 1064 (1938).
- 162.—DEWAN, J. G.—Biochem. J. 33, 549 (1939).
- 163.—BRAUNHSTEIN, A. E. y KRITZMANN, M. G.—Nature. 140, 503 (1937).
- 164.—COHEN, P. P.—J. Biol. Chem. 136, 565 y 585 (1940).
- 165.—HARE, M. L.—Biochem. J. 22, 968 (1928).
- 166.—BLASCHO, H., RISCHE, D. y SCHLOSSMANN, H.—Biochem. J. 31, 2187 (1937).
- 167.—KOHN, H. T.—Biochem. J. 32, 1593 (1937).
- 168.—BLASCHKO, H., RICHTER, D. y SCHLOSSMANN, H.—J. physiol. 89, 6 y 90, 1 (1937).
- 169.—ZELLER, E. A.—Advanc. in Enzym. 2, 93 (1942).
- 170.—BEST, C. H.—J. physiol. 67, 256 (1929).
- 171.—ZELLER, E. A.—Advanc. in Enzym. 2, 93 (1942).
- 172.—SWEDIN, B.—Chem. Abstracts. 39, 3013 (1945).

- 173.—THUNBERG, T.—Skand. Arch. physiol. **40**, 1 (1920).
- 174.—AHLGREEN.—Skand. Arch. physiol. **47**, sup. 1 (1925).
- 175.—BEREND Y TANGL.—Biochem. Z **232**, 181 (1931).
- 176.—LANG, K.—Z. physiol. Chem. **261**, 240 (1939).
- 177.—LANG, K. Y MAYER, H.—Z. physiol. Chem. **262**, 120 (1940).
- 178.—CREMER, H. D.—Z. physiol. Chem. **263**, 240 (1940).
- 179.—DIXON, M., Y LUTWAK-MAN, C.—Biochem. J. **31**, 1347 (1937).
- 180.—EULER, H. VON.—Z. physiol. Chem. **175**, 52 (1928).
- 181.—BATELLI, F. Y STERN, L.—Compt. rend. Soc. biol. **62**, 742 (1910).
- 182.—PARNAS, J. K.—Biochem. Z. **28**, 274 (1910).
- 183.—NEUBERG, C. Y HIRSCH, J.—Biochem. Z. **96**, 175 (1919).
- 184.—DIXON, M. Y LUTWAK-MAN, C.—Biochem. J. **31**, 1347 (1937).
- 185.—WIELAND, H.—Ber. d. deuts. Chem. Ber. Ges. **47**, 2085 (1914).
- 186.—NEUBERG, C.—Biochem. Z. **49**, 502 (1913); **51**, 484 (1913).
- 187.—DAKIN, H. D. Y DUDLEY, H. W.—J. Biol. Chem. **14**, 155 (1913).
- 188.—NEUBERG, C. Y LOHMANN, K.—Biochem. Z. **254**, 332 (1932).
- 189.—JOWETT, M. Y QUASTEL, J. H.—Biochem. J. **27**, 486 (1933).
- 190.—MICHAELIS, L.—Cold. Spring. Harbor Symposia-Quant Biol. **7**, 33 (1939).
- 191.—HAAS, E., HORECKER, B. L. Y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **136**, 747 (1940).
- 192.—WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W.—Naturwissenschaften. **20**, 688-980 (1932).
- 193.—WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **254**, 438 (1932); **257**, 492; **266**, 377 (1933).
- 194.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **290**, 293 (1937).
- 195.—KUHN, R.—Ber. Chem. Ges. **69**, 2557 (1936).
- 196.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **278**, 263 (1935).
- 197.—THEORELL, H.—Nature. **138**, 687 (1936).
- 198.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **288**, 317 (1936).
- 199.—GUZMÁN BARRÓN, E. S.—Biological Oxidations and Reductions, pág 9 (1941).
- 200.—OKUNUKI, K. Y YAKUSHIJI, E.—Proc. Imp. Acad. (Tokio), **16**, 144 (1940).
- 201.—WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **254**, 438 (1932).
- 202.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **275**, 344 (1934); **278**, 263 (1935).
- 203.—KUNH, R. Y BOULANGER P.—Ber. Chem. Ges. **69**, 1557 (1936).
- 204.—LAKI, K.—Z. physiol. Chem. **249**, 71 (1936).
- 205.—WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **266**, 377 (1933).
- 206.—EULER, H. VON, Y HELLSTROM, H.—Z. physiol. Chem. **252**, 31 (1938).
- 207.—DEWAN, J. G. Y GREEN, D. E.—Biochem. J. **31**, 1069 (1937).
- 208.—HAASE, K.—Naturwissenschaften **26**, 187 (1938).
- 209.—STRAUB, F. B.—Nature, **143**, 76 (1939).
- 210.—ABRAHAM, E. P. Y ADLER, E.—Biochem. J. **34**, 119 (1940).
- 211.—STRAUB, F. B., DEWAN, J. G. Y GREEN, D. E.—Nature, **143**, 76 y 189 (1939).
- 212.—OKUNUKI, K., Y YAKUSHIJI, E.—Proc. Imp. Acad. (Tokio). **16**, 144, 1481 (1940).
- 213.—FISCHER, F. G. Y EYSENACH, H.—Ann. Chem. **530**, 99 (1937).
- 214.—FISCHER, F. G., ROEDIG, A. Y RAUCH, K.—Naturwissenschaften. **27**, 197 (1939).
- 215.—FISCHER, F. G.—Ann. Chem. **552**, 203 (1942).
- 216.—HAAS, E.—Biochem. Z. **298**, 378 (1938).
- 217.—HAAS, E., HORECKER, B. L., Y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **130**, 425 (1939).
- 218.—HAAS, E., HARRER, C. J., Y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **143**, 344 (1942).
- 219.—HAAS, E., HARRER, C. J. Y HOGNESS, T. R.—Biol. Symp **5**, 119 (1941).
- 220.—HAAS, E., HARRER, C. J., Y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **143**, 344 (1942).
- 221.—ALTSCHUL, A. M., PERSKY, H. Y HOGNESS, T. R.—Science **94**, 349 (1941).
- 222.—PARNAS, J. K.—Nature, **151**, 577 (1943).
- 223.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **288**, 317 (1936).
- 224.—HAAS, E.—Naturwissenschaften. **22**, 207 (1934).
- 225.—WARBURG, O. Y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **275**, 464 (1934).
- 226.—EULER, H. VON Y MYRBACK, K.—Ergeb. Enzymforsch. **2**, 139 (1933)

- 227.—EULER, H. VON y SCHLENK, F.—Z. physiol. Chem. **246**, 64 (1937).
- 228.—WARBURG, O., CHRISTIAN, W., y GRIESE, A.—Biochem. Z. **282**, 157 (1935).
- 229.—SCHLENK, K.—Advances in Enzymology, vol. III (1943).
- 230.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **287**, 291 (1936).
- 231.—VESTIN, R.—Naturwissenschaften. **25**, 667 (1937).
- 232.—ADLER, E., ELLIOT, S., y ELLIOT, L.—Enzymologia **8**, 80 (1940).
- 233.—SCHLENK, F.—Arch. Biochem. **3**, 93 (1943).
- 234.—MEYERHOF, O.—Ergeb. Physiol. Exptl. Farmakol. **39**, 10 (1936).
- 235.—DIXON, M. y ZERFAS, L. G.—Biochem. J. **34**, 371 (1940).
- 236.—PARNAS, J. K.—Nature, **151**, 577 (1943).
- 237.—HARDEN, A., YOUNG, W. J.—J. Physiol. **32**. Proc. of. Nov. (1904-1905).
- 238.—GREEN, D. E., y DEWAN, J. G.—Biochem. J. **31**, 934 (1937).
- 239.—KLEIN, J. R.—J. Biol. Chem. **134**, 43 (1940).
- 240.—WILLIANSO, S. y GREEN, D. E.—J. Biol. Chem. **135**, 345 (1940).
- 241.—MYRBACK, K.—Ergeb. Enzymforsch. **2**, 139 (1933).
- 242.—BALL, E. J. y RAMSDELL, A.—J. Biol. Chem. **131**, 767 (1939).
- 243.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **254**, 438 (1932).
- 244.—WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—Biochem. Z. **275**, 112 y 464 (1934-35).
- 245.—EULER, H. VON, y ADLER, E.—Z. Physiol. Chem. **252**, 41 (1938).
- 246.—VESTIN, R.—Naturwissenschaften **25**, 667 (1937).
- 247.—WILLIAMS, R. R.—J. Am. Chem. Soc. **58**, 1504 (1936).
- 248.—LIPMANN, F.—Nature (Londres). **138**, 1097 (1936) y **143**, 436 (1939).
- 249.—CLARK, V. M.—J. Applied. Physics. **9**, 99 (1938).
- 250.—MACMUNN C. A.—Trans. Proc. Roy. Soc. (Londres). **177**, 267 (1886).
- 251.—BALL, E. G. y MEYERHOF, B.—J. Biol. Chem. **134**, 483 (1940).
- 252.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (Londres). **98**, 312 (1925).
- 253.—KEILIN, D.—Nature (Londres). **141**, 870 (1938).
- 254.—KEILIN, D., y HARTREE, E. F.—Proc. Roy. Soc. (Londres). **13**, 127 y 167 (1939).
- 255.—YAKUSHIJI, E., y OKUNUKI, K.—Proc. Imp. Acad. (Tokyo). **17**, 38 (1941).
- 256.—BACH, S. J.—Nature, **149**, 21 (1942).
- 257.—HAAS, E., HARRER, C. J. y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **136**, 747, 1940.
- 258.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **106**, 418 (1930).
- 259.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **279**, 463 (1935); **285**, 207 (1936).
- 260.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **122**, 298 (1937).
- 261.—KEILIN, D., y HARTREE, E. F.—Biochem. J. **39**, 289 (1945).
- 262.—KEILIN, D.—Nature. **145**, 934 (1940).
- 263.—HAAS, E., HORECKER, B. L. y HOGNES, T. R.—J. Biol. Chem. **130**, 425 (1939); **136**, 747 (1940).
- 264.—THEORELL, H., y AKESON, A.—J. Am. Chem. Soc. **63**, 1804 (1940).
- 265.—MEYER, H., y ZEILE, K.—Z. physiol. Chem. **262**, 178 (1939).
- 266.—THEORELL, H.—J. Am. Chem. Soc. **63**, 1804 (1941).
- 267.—THEORELL, H.—Biochem. Z. **298**, 242 (1938); **301**, 201 (1939).
- 268.—THEORELL, H.—J. Am. Chem. Soc. **63**, 1804 (1941).
- 269.—STOTZ, E., SIDWELL, A. E., y HOGNESS, T. R.—J. Biol. Chem. **124**, 11 (1938).
- 270.—THEORELL, H.—Hand. d. enzym. d. Nord y Weidemhagen, pág. 862 (1940).
- 271.—BALL, E. J.—Biochem. Z. **295**, 262 (1930).
- 272.—COOLIDGE, T. B.—J. Biol. Chem. **98**, 755 (1932).
- 273.—WURMSER, R. y FILITTI-WURMSER.—J. Chim. Phys.: **35**, 81 (1938).
- 274.—THEORELL, H.—Naturwissenschaften. **29**, 172 (1941).
- 275.—ZEILE, K.—Ergeb. Enzymforsch. **9** (1943).
- 276.—HAAS, E.—Naturwissenschaften. **22**, 207 (1934).
- 277.—BANGA, I.—Z. physiol. Chem. **244**, 130 (1936).
- 278.—STARE, F. J.—Biochem. J. **30**, 2257 (1936).
- 279.—GOFSY, B., y SZENT-GYORGYI, A.—Z. physiol. Chem. **224**, 1 (1934).
- 280.—QUASTEL, J. H., y WOOLDRIDGE, V. R.—Biochem. Z. **22**, 689 (1928).

- 281.—STRAUB, F. B.—Z. physiol. Chem. **249**, 189 (1937).
- 282.—SZENT-GYORGYI, A., STRAUB, F. B. y LAKI, K.—Z. physiol. Chem. **247** (1937).
- 283.—SZENT-GYORGYI, A.—Z. physiol. Chem. **236**, 7 (1935); **244**, 105 (1936).
- 284.—GREEN, D. E.—Biochem. J. **30**, 2095 (1936).
- 285.—BANGA, I.—Z. physiol. Chem. **249**, 200 y 205 (1937).
- 286.—LAKI, K.—Z. physiol. Chem. **249**, 61 (1937).
- 287.—FISCHER, F. G., y EYSENACH, H.—Ann. Chem. **530**, 99 (1937).
- 288.—ALWALL, L. y LEHMANN, J.—Skand. Arch. Physiol. **61**, 159 (1931).
- 289.—SZENT-GYORGYI, A.—Studies on Biological Oxidation. Leipzig (1937).
- 290.—BALL, E. G.—Symposium on Respiratory Enzymes. pag. 35 (1942).
- 291.—LIPMANN, F.—Advanc. in Enzymology. **1** (1941).
- 292.—WOOD, H. G., y WERKMAN, C. H.—J. Biol. Chem. **135**, 789 (1940).
- 293.—FISCHER, F. G., y EYSENACH, H.—Ann. Chem. **530**, 99 (1937).
- 294.—GREEN, D. E.—Biochem. J. **31**, 1074 (1937).
- 295.—POTTER, V. R.—J. Biol. Chem. **134**, 417 (1940).
- 296.—SZENT-GYORGYI, A.—Z. physiol. Chem. **249**, 221 (1937).
- 297.—PARNAS, J. K.—Enzymologia, **5**, 166 (1938).
- 298.—CORI, G. T., y CORI, C. F.—J. Biol. Chem. **135**, 733 (1940).
- 299.—KIESSLING, W.—Naturwissenschaften, **27**, 129 (1939).
- 300.—HANES, C. S.—Proc. Roy. Soc. (Londres). B. **128**, 421 (1940); **129**, 174 (1940).
- 301.—NEEDHAM, J., y LEHMANN, H.—Biochem. J. **31**, 1210 (1937).
- 302.—COLOWICK, C. K., y SUTHERLAND, E. W.—J. Biol. Chem. **144**, 423 (1942).
- 303.—MEYERHOF, O., y LOHMANN, K.—Naturwissenschaften. **22**, 134 (1924).
- 304.—MEYERHOF, O., y KIESSLING, W.—Biochem. Z. **279**, 40 (1935).
- 305.—MEYERHOF, O., y LOHMANN, K.—Biochem. Z. **286**, 317 (1936).
- 306.—NEGELIN, E., y BROMEL, H.—Biochem. Z. **303**, 132 (1939).
- 307.—MEYERHOF, O., y JUNOWICZ-KOCHOLATY, R.—J. Biol. Chem. **149**, 71 (1943).
- 308.—MEYERHOF, O.—Biol. Symposia. **5**, 141 (1941).
- 309.—BUCHER, T.—Naturwissenschaften, **30**, 756 (1942).
- 310.—KUBOWITZ, F., y OTT, P.—Biochem. Z. **317**, 193 (1944).
- 311.—MEYERHOF, O., y KIESSLING, W.—Biochem. Z. **279**, 40 (1935).
- 312.—MEYERHOF, O., y KIESSLING, W.—Naturwissenschaften, **22**, 838 (1934).
- 313.—MEYERHOF, O., y KIESSLING, W. G.—Biol. Chem. **149**, 71 (1943).
- 314.—PARNAS, J. K.—Bull. Soc. Chem. biol. **18**, 62 (1936).
- 315.—MEYERHOF, O.—Biochem. Z. **298**, 396 (1938).
- 316.—LARDY, H. A., y ZIEGLER, J. A.—J. Biol. Chem. **159**, 343 (1945).
- 317.—LIPMANN, F.—Advances in Enzymology. **1**, 99 (1941).
- 318.—GUZMÁN BARRÓN, E. S.—Advances in Enzymology. **3**, 149 (1943).
- 319.—MEYERHOF, O.—Biol. Symposia. **5**, 141 (1941).
- 320.—MEYERHOF, O. y KIESSLING, W.—Biochem. Z. **283**, 83 (1935).
- 321.—NEGELEIN, E., y BROMEL, H.—Biochem. Z. **303**, 231 (1939).
- 322.—KREBS, H. A., y JOHNSON, V. A.—Biochem. J. **31**, 645 (1937).
- 323.—LIPMANN, F.—Cold. Spring. Harbor Symposia Quant. Biol. **7**, 248 (1939).
- 324.—BANCA, I.—Nature. **144**, 74 (1939).
- 325.—OCHOA, S.—Biochem. J. **33**, 1109 y 1180 (1939).
- 326.—PETERS, R. A.—J. Biol. Chem. **138**, 751 (1941).
- 327.—LIPMANN, F.—Federation Proc. **1**, 122 (1942).
- 328.—LIPMANN, F.—Enzymologia, **4**, 65 (1937).
- 329.—LIPMANN, F.—Advances in Enzymology, **1**, 99 (1941).
- 330.—CLARK, V. M.—J. Applied. physics. **9**, 97 (1938).
- 331.—LIPMANN, F.—Nature (Londres), **138**, 1097 (1936) **143**, 436 (1939).
- 332.—THUNBERG, T.—Skand Arch. physiol. **40**, 1 (1920).
- 333.—WERKMAN, C. H.—Arch. Biochem. **2**, 97 (1943).
- 334.—KREBS, H. A., y JOHNSON, W. A.—Enzymologie. **4**, 148 (1937).
- 335.—KREBS, H. A.—Biochem. J. **32**, 973 (1938).

- 336—KREBS, H. A.—*Biochem. J.* **34**, 442, 775, 1234 (1940).
- 337.—MARTIUS, Z.—*Physiol. Chem.* **246**, 1 (1937) y **247**, 104 (1937).
- 338.—SZENT-GYORGYI, A. y GOZSY, B.—*Z. physiol. Chem.* **224**, 1 (1934).
- 339.—KREBS, H. A., y JOHNSON, W. A.—*Enzymologia.* **4**, 148 (1937).
- 340.—KREBS, H. A. y EGGLESTON, L. V.—*Biochem. J.* **34**, 442, 460, 775 (1940).
- 341.—WOOD, H. G., y WERKMAN, C. H.—*J. Biol. Chem.* **135**, 789 (1940).
- 342.—KREBS, H. A., y EGGLESTON, L. V.—*Biochem. J.* **34**, 1380 (1940).
- 343.—KRAMPITZ, L. O. y WERKMANN, C. H.—*Biochem. J.* **35**, 595 (1941).
- 344.—WOOD, H. G.—*J. Biol. Chem.* **139**, 377 y 483 (1941); **142**, 31 (1942)
- 345.—EVANS, E., y SLOTIN, L.—*J. Biol. Chem.* **136**, 301 (1940).
- 346.—MARTIUS, C., y KNOOP, F.—*Z. physiol. Chem.* **242**, 1 (1936).
- 347.—EVANS, E. A. y SLOTIN, L.—*J. Biol. Chem.* **141**, 439 (1941)
- 348.—WOOD, H. G., y WERKMAN, C. H.—*J. Biol. Chem.* **139**, 483 (1941).
- 349.—LIPMANN, F.—*Federation Proc.* **1**, 122 (1942).
- 350.—GREEN, D. E., WESTERFIELD, V. V., etc.—*J. Biol. Chem.* **140**, 683 (1941).
- 351.—OCHOA, S.—*J. Biol. Chem.* **160**, 373 (1945).
- 352.—GREEN, D. E.—*J. Biol. Chem.* **140**, 685 (1941).
- 353.—GUZMÁN BARRÓN, E. S.—Lyman, C. M., etc. *J. Biol. Chem.* (1941).
- 354.—OCHOA, S.—*J. Biol. Chem.* **149**, 577 (1943).
- 355.—SZENT-GYORGYI, A.—*Z. physiol. Chem.* **244**, 105 (1936).
- 356.—PARNAS, J. K., y SZANKOWSKY, W.—*Enzymologia.* **3**, 220 (1937).
- 357.—SMYTH, A. H.—*Biochem. J.* **34**, 1046 (1940).
- 358.—BANGA, I., OCHOA, S., y PETERS, R. A.—*Biochem. J.* **33**, 1989 (1939).
- 359.—BAUMAN, C. A., y STARE, F. J.—*J. Biol. Chem.* **133**, 183 (1940).
- 360.—LUNDSGAARD, E.—*Biochem. Z.* **161**, 219 (1925); **217**, 162 (1930) y **220**, 8 (1932).
- 361.—BARKER, S. B., SKORR, E., y MALAM, M.—*J. Biol. Chem.* **129**, 33 (1939).
- 362.—WARBURG, O., y CHRISTIAN, W.—*Biochem. Z.* **282**, 157 (1935); **292**, 287 (1937).
- 363.—LIPMANN, F.—*Nature.* **138**, 588 (1936).
- 364.—DICKENS, F.—*Biochem. J.* **32**, 1626, 1645 (1938).
- 365.—BALDWIN, E.—*Dinamic Aspects of Biochemistry*, pág. 407 (1947).
- 366.—BREUSCH, F. L.—*Scienza.* **97**, 490 (1943).
- 367.—LARDY, H. A.—(Comunicación particular a Potter, W. R.) *Advance in Enzymol.* **4** (1944).
- 368.—BREUSCH, F. L.—*Biochem. J.* **33**, 1757 (1939).
- 369.—WIELAND, H. y ROSENTHAL, C.—*Ann.* **554**, 241 (1943).
- 370.—BRAUNHSTEIN, A. E., y KRITSMANN, M. G.—*Nature* **140**, 503 (1937).
- 371.—COHEN, P. P.—*J. Biol. Chem.* **136**, 565 y 585 (1940).
- 372.—GREEN, D. E., LOLOIR, L. F., y NOCITO, V.—*J. Biol. Chem.* **161**, 559 (1945).
- 373.—SCHLENK, F. y SCHNELL, E. E.—*J. Biol. Chem.* **157**, 425 (1945).
- 374.—SCHNELL, E. E.—*J. Ann. Chem. Soc.* **67**, 194 (1945).
- 375.—BLOCH, V., y PINOESCH, H.—*Z. physiol. Chem.* **239**, 236 (1936).
- 376.—HOLTZ, P., y CREDNER, —*Z. physiol. Chem.* **280**, 1 (1944).
- 377.—HOLTZ, P., y CREDNER, —*Arch. exptl. Path. Pharmokol.* **280**, 9 (1944).
- 378.—SZENT-GYORGYI, A.—*Bull. Soc. Chim. Biol.* **20**, 846 (1938).
- 379.—BOSWELL, J. G., y WHITING, G. C.—*Ann. Botany.* **11**, 847 (1938).
- 380.—TAUBER, H.—*Enzymologia.* **1**, 209 (1936).
- 381.—HUSZAK, ST.—*Z. physiol. Chem.* **247**, 239 (1937).

CONTESTACION
DEL
EXCMO. SR. D. MANUEL LORA TAMAYO

Señores Académicos:

Este acto de recepción a que asistimos es el segundo de los que se producen con motivo de la elección hecha, de acuerdo con los nuevos Estatutos de la Real Academia de Farmacia. Por virtud de ellos, incorporamos a nuestras tareas personalidades destacadas procedentes de campos distintos al genuinamente farmacéutico, pero afines con él.

Deseo iniciar mi intervención de hoy subrayando la significación que está amplitud de concepto supone, por lo que pueda tener de ejemplar y por lo que tiene en todo caso de realidad consoladora. Ante la lucha entre profesionales de cualquier grupo que buscan en el exclusivismo amparo a la mediocridad, siempre pensé que era desde arriba, en el estrato superior de la selectocracia científica, donde había de resplandecer la conducta aleccionadora. En esta nuestra ordenación actual, hay efectivamente la visión clara de que, por encima de la ineludible especialidad a que obliga la división del trabajo, existe unidad de principio que excluye todo acotamiento. Como en lo biológico, en que cada célula cumple su función, pero todas se conjugan armónicamente en la integridad de la vida del individuo, de forma que la incoordinación o la discontinuidad crean lo morboso, cuando en el desarrollo de las actividades humanas nos aislamos en grupos que pretenden ignorarse o que, conociéndose, se hostilizan, el cuerpo social se resquebraja y no hay forma de enderezarlo en unidad saludable.

Damos aquí, con esta nueva reglamentación, que permite traer a nuestro seno especialistas distintos con independencia de todo prejuicio de títulos, una ancha prueba de comprensión. Y ciertamente que en la elección se ha visto recompensada la pureza de nuestras intenciones. Creo que hemos sabido seleccionar bien aquellas especialidades que más puede interesarnos vincular. Junto a los representantes de nuestras ciencias básicas, químico y naturalista, el de la Ingeniería,

que aplica los conocimientos de aquéllas a la técnica de la fabricación; el de la Medicina, que con la aguda inquietud del dolor humano puede espolear nuestros afanes de estudio; y el Moralista, en fin, dichosamente representado por una ilustre figura de la Iglesia, que, por serlo así, infundirá en nuestra actuación ese superior espíritu que en la vida profesional ha de iluminar nuestro entendimiento no sólo ante el auténtico dilema moral, poco frecuente en nosotros, sino informando permanentemente el sentido ético que ha de imponerse siempre al hombre de estudio.

Dios querrá que este superior tejido que entre todos tramamos, sin pérdida ni menoscabo de la propia individualidad, cubra y proteja a nuestras profesiones de esa frialdad del exclusivismo, en el que perecerán siempre los mejores afanes.

Si es grato para el que os habla recibir en nombre de la Academia a quien es llamado con esta condición extraña a la nuestra, sin sombra alguna de antecesor cuyo recuerdo empañe el júbilo de la solemnidad, la complacencia aumenta cuando el que llega es persona como el Profesor Ipiéns Lacasa, al que me unen fuertes lazos de compañerismo y sólida amistad.

Está bien escogido para sumarse a nuestra obra el maestro que inició en los estudios de la Química a muchas promociones de farmacéuticos. Si la enseñanza es un sacerdocio que supone en el que lo ejerce toda la abnegación de una entrega sin condiciones, Ipiéns es, sin duda, un auténtico símbolo de lo que debe ser el Magisterio y de las cualidades que han de adornar al que lo ejerce.

Nada más fácil para un dibujante de afición que encontrar en el modelo perfiles bien acusados y rasgos predominantes: bastan entonces pocos trazos para reproducir con bastante exactitud una silueta. Yo creo ver con claridad en la personalidad de Ipiéns perfiles bien definidos que pueden retratarlo, pero por si mi torpeza al no descubrirlos suficientemente en nuestra convivencia no permitiera una clara definición, ahí tenéis el discurso que acabáis de oírle como plena demostración de sus rasgos.

La clara y metódica ordenación de su trabajo, el agotamiento del tema en un estudio bibliográfico intenso, la incorporación de éste hasta hacerlo cosa propia para ofrecerlo después en esa exposición llena de personalidad, sin ocultar nada de lo sabido con toda la autenticidad de una bien detallada referencia, destacan claramente las cualidades esenciales del maestro: amplitud y densidad de doctrina, estudio profundo, honradez científica, dotes de transmisión.

Confieso mi ignorancia de los preceptos pedagógicos. No sé lo que haya en ellos de arte, de ciencia o de intuición, pero sí sé deciros, con

la experiencia del catador empírico, lo que es solera de calidad y lo que es espíritu de mala clase. En Ipiéns hay calidades superiores de maestro que tienen sus raíces en una vocación a la que entregó su vida entera. Alumno brillante de la Facultad de Ciencias de Barcelona, alcanza con Premio Extraordinario el Grado de Licenciado en Ciencias Químicas, y en 1913, a los veintidós años de su nacimiento en Biescas (Huesca) llega al Profesorado en la Cátedra de Química general, Electroquímica y Análisis químico de la Escuela Industrial de Cádiz. En 1916, tres años después, es ya Catedrático de Química general en la Universidad de Murcia, de donde pasa a la de Valencia, y, últimamente, a la de Química Experimental de Madrid, en abril de 1941.

Sus dotes de maestro resaltan no sólo en la tarea diaria de la cátedra, sino al pasar al libro el fruto sazonado de sus conocimientos y experiencia. Así se muestra como excelente tratadista en sus *Elementos de Química*, que alcanza la quinta edición, y en otras publicaciones diversas que reproducen discursos académicos o conferencias, o dan cuenta con preciso rigor científico de resultados de investigaciones, especialmente oceanográficas, de cuya Comisión Oficial de Estudios formó parte, mereciendo ser designado Profesor agregado del Instituto Español de Oceanografía y asistiendo como tal a la conferencia internacional para la exploración científica del Mediterráneo.

No se puede ser maestro universitario sin sentir íntimamente la vida colectiva de la Universidad y no es extraño que el hombre de vocación académica pueda juzgar como un deber ineludible el de prestar su colaboración en aquel puesto de la organización corporativa donde sus servicios sean solicitados. Así, Ipiéns fué, porque debió serlo, Vice-Rector en Murcia, Secretario en Valencia y hoy Vice-Decano en Madrid.

También sus cualidades para la tarea colectiva se perfilan acusadamente; pero, asimismo, volvemos a encontrarlas bien reflejadas en su discurso. Le atrae, sin duda, el tema de las oxidaciones y reducciones biológicas cuando nos ofrece su estudio en este acto de su ingreso; pero, no ya en la esencia misma del proceso, sino a través de las consideraciones de todo orden que le sugiere, late el subconsciente de su predilección. Hay en todos los sistemas oxidativos que estudia, una gradación de mecanismos parciales que concurren en la integración del fenómeno. Todos esos esquemas en los que unas flechas dirigen a sucesivas etapas de deshidrogenación, son como gráfico de unas deducciones lógicamente escalonadas que, partiendo de un principio, llegarán gradualmente a una conclusión. Así es Ipiéns en la ordenación de sus actos. Se rige por todo un sistema de reacciones en cadena que van de la impresión a la elaboración de la idea, y de ésta a la realización

por pasos graduados, sin explosiones ni desgastes innecesarios que despilfarran la actividad. Así la obra a su cargo resplandece siempre con el sello de lo reflexivo y ordenado, sin conceder puesto alguno a la improvisación.

Ordenación la suya que, si me apuráis, resulta a veces severamente autodirigida. Lo preceptivo, lo ortodoxo, corta, por boca de Ipiéns, el curso de toda discusión. No hay nada tan desalentador como discutir con quien acostumbra a tener razón, y si me guardáis el secreto cerca de él, para que nunca me lo pueda recordar, yo os diré que la suele tener con «excesiva» frecuencia.

En el acabado estudio con que nos ha obsequiado nuestro nuevo colega, que yo invito a releer por el deleite que produce su estilo limpio y la agilidad con que maneja fundamentales conceptos, queda bien de manifiesto la diversidad de aspectos que ofrece el complejo problema de la oxidación biológica. Se cuida mucho de destacarlos, desde la apreciación de su naturaleza catalítica esencial hasta el desarrollo energético de las reacciones integrantes del proceso, que analiza, como cuerpo fundamental de su trabajo, con claro sentido expositivo y aguda visión científica. El químico, el fisiólogo, el fisico-químico y aun el termodinámico, tienen, sin duda, interesantes facetas que considerar, y en sus respectivos campos de trabajo hay temario suficiente para nuevas contribuciones. Estamos, sin duda, ante uno de los más importantes mecanismos biológicos, a cuya interpretación total se llega en composición de direcciones, aunque sólo sea para completar y no para corregir, siguiendo el juicio de Krebs, que Ipiéns invoca al juzgar los distintos sistemas formulados, mejor como incompletos que como incorrectos.

Más por atención obligada a la valía del estudio, que por hacer aportación alguna, difícil siempre cuando aquél se hace en forma tan exhaustiva, voy a detenerme en dos aspectos interpretativos del proceso considerado por constituir inquietudes actuales en nuestra disciplina científica y aún en nuestras direcciones de trabajo.

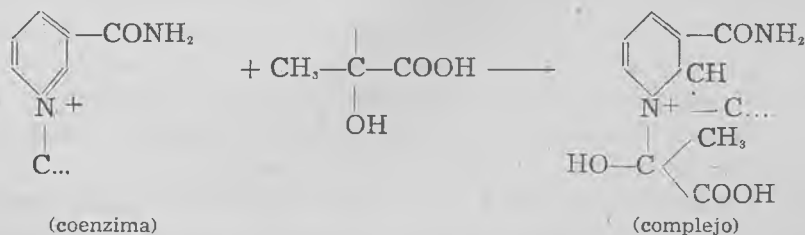
En el modo de actuar de las deshidrogenasas, componentes esenciales de cualquier sistema oxidativo, parece admitirse, en efecto, que en cada fenómeno parcial sustraen aquéllas un par de átomos de hidrógeno; pero las observaciones de Michaelis y de Haber y Willstätter (1931), que aporta Ipiéns en su información, permiten ya discurrir sobre la base de un mecanismo de cadena con producción de *radicales libres*, que en algunos casos observaron aquellos experimentadores.

Puede afirmarse que en el último decenio se desarrollan notablemente las investigaciones sobre radicales libres, relacionando su formación con el mecanismo de las más diversas reacciones orgánicas. Un

gran número de reacciones en fase gaseosa o en disolventes no polares no proceden por transferencia de electrones, sino por producción intermedia de radicales libres. La caracterización de radicales fenilo en numerosos procesos, no sólo por la técnica de Paneth, sino por formación de bifenilo y sustracción de hidrógeno del disolvente, abre una amplia vía a la interpretación de numerosas reacciones entre compuestos aromáticos. Transformaciones de diazocompuestos, descomposiciones de peróxidos, extrañas reacciones de sales de Ag con Bromo, fenómenos de fotólisis de aldehidos y cetonas, fotohalogenación, acciones diversas del tetraceto de Pb, incluso procesos técnicos como el de vulcanización del caucho, últimamente considerado, se interpretan, con fuerte aportación experimental, como mecanismos en que intervienen radicales libres.

No podría eludirse, ciertamente, el estudio de la posible aplicación de estos mecanismos en el campo de la bioquímica, y precisamente en el de las oxidaciones biológicas, donde las enzimas que intervienen han de actuar como aceptores de hidrógeno. Waters (*Trans. Faraday Soc.* 1943. 39, 145) establece mecanismos de este orden precisamente en los sistemas láctico-pirúvico y succínico-fumárico.

La cadena se inicia funcionando el catalizador como un radical libre que sustrae un H. del ácido láctico, dejando de éste el radical $\text{CH}_3\text{—COH—CO}_2\text{H}$ capaz de reaccionar con la coenzima de Warburg para dar un complejo



que una nueva molécula de ácido láctico hidrogena con creación otra vez del radical libre, hidrolizándose por otra parte el complejo hidrogenado para dar el ácido pirúvico.

De forma semejante, puede interpretarse el sistema succínico-fumárico, desempeñando la coenzima en todos los casos el papel de generador de un radical activo en una reacción de cadena, en tanto que el grupo prostético del catalizador enzimático proporciona el radical libre inicial.

Encuentra apoyo esta hipótesis, de una parte, en la analogía cinéti-

ca entre las reacciones enzimáticas y las reacciones en cadena y, de otra, por la caracterización de radicales libres en los grupos prostéticos de algunas deshidrogenasas, probándose por determinaciones magnéticas la aparición de aquéllos en la reducción parcial de la riboflavina y de la piocianina bacteriana. Más recientemente Waters (*Trans. Far.* 1946, 42, 184) acumula confirmación a la hipótesis, con la evidencia de que los radicales tiol producidos en la disociación de disulfuros, presentes en la mayor parte de las proteínas enzimáticas, puedan aceptar hidrógenos de otros substratos en su presencia. Hay, sin duda, una amplia posibilidad de experimentación en este aspecto del mecanismo íntimo de la reacción enzimática deshidrogenante.

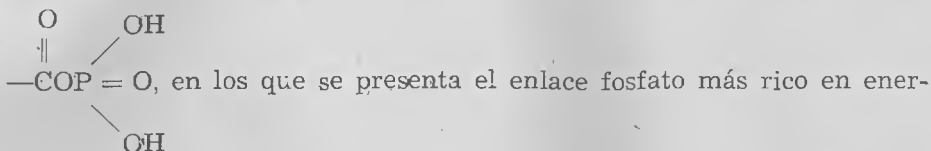
Por otra parte, desde el punto de vista químico, toda hipótesis interpretativa ha de apoyarse en experiencias con modelos orgánicos: razonamos sobre la base de productos identificados en los órganos de estudio y hemos de admitir ante cada fracaso de nuestro trabajo experimental la existencia de un nuevo fermento que suple en lo biológico la impotencia del laboratorio. ¿Cómo y en qué condiciones transportables a los tejidos vivos se condensarían los ácidos oxalacético y pirúvico para originar el ácido cítrico? Esta condensación, perfectamente previsible en su aspecto teórico, ¿por qué tipo de grupos podría ser catalizada? Ipiéns, en algún punto de su trabajo se refería a las experiencias de Langenbeck sobre modelos de fermentos. Su hipótesis fundamental ha informado algunos trabajos nuestros, y por ello nos identificamos con sus principios; pero así como en una metódica orgánica se pueden prefijar grupos que activen una descarboxilación o acepten hidrógeno o promuevan transesterificaciones, en condiciones más o menos suaves, ¿qué activadores podrían ensayarse como modelos de catalizadores biológicos en la condensación? Asombra considerar la tupida red de procesos enzimáticos desconocidos en su esencia, a través de la que avanza el mecanismo de la oxidación biológica.

Para el químico que, acaso con espíritu simplista o quizá también por altiva ambición quisiera captar entre sus matraces la esencia de cada proceso vivo, se abre un mundo de interrogantes en cada paso, a cuya respuesta completa ofrece superiores dificultades el entrecruce de agrupamientos y sistemas coexistentes en simultánea actuación al integrar el proceso.

Pero en el caso considerado, no podemos olvidar, como factor de superior importancia, los enormes trasiegos de energía que se ponen a juego, capaces de suplir nuestros más fuertes recursos experimentales. La oxidación láctico-pirúvico supone un desarrollo de energía de 9 Kcal/mol., la de hidrato de aldehído a ión carboxílico 29 Kcal/mol. Ya dice Ipiéns que *la fosforilación constituye uno de los más finos y*

sutiles mecanismos que poseen las células para retener la energía que queda libre durante su actividad funcional.» Lo que supone que esta energía disponible puede servir para procesos sintéticos; y de tal forma es así, que existe una perfecta dependencia, funcionando en copulación, entre la oxidación del triosafosfato, p. e., y la fosforilización del ácido adenílico o del adenosinadifosfato a trifosfato.

En el estudio de este engranaje se han caracterizado unos interesantes compuestos, oportunamente citados en el trabajo de Ipiéns, pero que subrayo especialmente, los *acilfosfatos* de fórmula general



Corresponde, en efecto, al enlace de un éster fosfórico ordinario, una energía potencial de 1-3-Kcal./mol., mientras que excede de 10 Kcal./mol. en los acilfosfatos. Lipmann (1944) ha descubierto el acetilfosfato en la oxidación enzimática del ácido pirúvico; en ciertos procesos bacterianos parece formarse un butirilfosfato, y en este grupo han de incluirse también el adenilpirofosfato, la fosfocreatina y el fosfoenolpiruvato. Además, la adenosinatrifosfato, cuya síntesis está condicionada por la energía liberada en la oxidación del triosafosfato, supone una elevada acumulación de energía que puede servir para transferirse a otros grupos, determinando fosforilizaciones de amidinas, como la creatina o la arginina, o de gran número de grupos OH. Ha de estimarse así que el tipo de enlace acilfosfórico y el carácter de estas transfosforilizaciones deben ser tomadas en consideración al discurrir sobre modelos de fosfatasa, acaso ya más justificadamente que el actuar con grupos OH y NH₂. Y ya se ve, para la importancia de este estudio, la gran significación que los sistemas fosfatásicos tienen en el mecanismo de la oxidación.

Abriéndose más ampliamente aún en las aplicaciones de esta energía de enlace que los estudios biológicos ponen de manifiesto, Cori (1945), llega a producir con adenosinatrifosfato y la exoquinasa del músculo la fosforilización de la glucosa en posición 1, es decir, que pasando por el éster de Robinson (glucosa-6-fosfato) y el de Neuberg (fructosa-6-fosfato) obtiene el glucosa-1-fosfato (éster de Cori), cuya formación permite explicar hoy el mecanismo de síntesis biológica de los polisacáridos, y aún de los nucleósidos y glucósidos naturales, en general.

Ipiéns glosa este aprovechamiento energético hasta sus últimas consecuencias. Yo deseo, para terminar, apurar aún más el concepto. El

caudal energético de nuestro nuevo compañero, que es cuantioso, tiene en su labor diaria amplio margen de transferencia: una fracción de él queremos para nosotros, y en la ordenada perfección con que administra sus magníficas posibilidades, vemos la garantía de que no nos faltará nunca, asegurando así una energía de enlace que supore valiosa adquisición para el potencial, ya rico, de esta Academia.