COLOIDES
Y
FERMENTOS

Iniciación teórico-práctica para Médicos, Biólogos y Estudiantes de Biología y Medicina

---

JOSÉ M.ª SUSAETA

EDITORIAL LABOR, S. A.
BARCELONA - BUENOS AIRES
1927

24,80

COLOIDES
Y
FERMENTOS

COLOIDES
Y
FERMENTOS

Iniciación teórico-práctica para Médicos, Biólogos y Estudiantes de Biología y Medicina

Con un capítulo sobre la importancia y determinación de iones de Hidrógeno

POR

JOSÉ M.ª SUSAETA

Catedrático del Instituto de Vitoria, Doctor en Ciencias naturales, Médico, Pensionado en el extranjero por la Junta para ampliación de estudios e investigaciones científicas

✧

Con 69 ilustraciones intercaladas en el texto

LIBRERIA AMERICANA
VICUÑA HNAS.
CONCEPCION

EDITORIAL LABOR, S. A.

BARCELONA, Provenza, 88 | BUENOS AIRES, Piedras, 599

1927

Es propiedad. Queda hecho
el depósito que marca la ley

Talleres tipográficos de EDITORIAL LABOR, S. A. : Provenza, 88 - Barcelona

Santiago Reiser Pino.
1529.
Universidad de Concepción.
Esc. de Medicina.

PRÓLOGO

No admitiendo actualmente el concepto anticuado de una energía vital, y si creemos que en los fenómenos que se observan en los seres vivos actúan sólo las fuerzas que encontramos en el mundo no viviente, concluiremos que sólo profundizando en el estudio de la físico-química, podremos esperar comprender un día las causas y leyes de los acontecimientos vitales.

Ahora bien; en los animales y en las plantas aparece por doquier la materia en un estado especial denominado coloidal. Este estado no es propio de ciertas substancias ni exclusivo de los seres vivos, es sencillamente un estado de agregación particular de la materia y las más diversas substancias pueden adquirirlo. Lo importante para nosotros es que las propiedades de los cuerpos adquieren en este estado características en extremo interesantes, cuyo estudio es el objeto de la química de los coloides. Y dada la frecuencia con que la materia viva se presenta en tal estado, pudiéramos decir que la físico-química biológica se confunde con la físico-química de los coloides vitales.

Este estudio se ha hecho ya, más que un auxiliar, una de las ciencias fundamentales de la Biología general y de la Medicina, y resulta indispensable poseer sus elementos si se quiere penetrar en la explicación que hoy se da de un gran número de fenómenos y reacciones vitales. El objeto de este libro es precisamente poner estos fundamentos al alcance de los Médicos, Biólogos y estudiantes de Biología y Medicina de habla castellana, que ocupados en otros asuntos no pueden dedicar su tiempo a profundizar por ellos mismos en esta materia, esparcida casi exclusivamente en libros escritos en idiomas extranjeros. A aquéllos está dedicado; y por conocer las dificultades que en general presentan para nosotros los libros de esta naturaleza escritos por químicos, es decir, por individuos de una cultura matemática superior a la media que se encuentra entre Biólogos y Médicos, me he esforzado en evitar en lo posible tecnicismos, cálculos y fórmulas complicadas, y en usar un lenguaje y en descender a explicaciones que en ocasiones para un físico o un químico podrían parecer pueriles.

Al fin de cada capítulo van indicadas las orientaciones médicas y biológicas más importantes, que utilizan las propiedades coloidales en él estudiadas, como las principales variantes que aparecen en la

explicación de un fenómeno dado. En realidad, esta clasificación es artificial e impuesta por la necesidad de presentar los hechos más o menos clasificados y ordenados. Pero hay que tener en cuenta que en el más sencillo fenómeno vital, son, como es natural, de capital interés todas las propiedades coloidales.

Es evidente que la aplicación de los conocimientos de la química coloidal al estudio de los seres vivos está todavía en sus primeros pasos, y que en muchísimos terrenos de la Biología y Medicina no se osa todavía aventurarse en buscar la explicación físico-química de los hechos. Pero también es cierto que por poco que sea lo andado y por difícil que nos parezca el camino, es el único a seguir en la mayoría de los casos. Por eso estos primeros pasos resultan particularmente atrayentes y prometedores.

Un capítulo va dedicado a la cuestión de la importancia y determinación de la concentración en los diferentes medios de los iones de hidrógeno o como abreviando se dice de los « pH » por ser asunto de que con mucha frecuencia hay que echar mano al estudiar los coloides y los fermentos.

Por último, en el Apéndice II se recuerdan en breves páginas las fórmulas y nociones de química biológica más precisas para poder comprender las reacciones más importantes de que se habla en el curso del libro.

Habiendo tenido ocasión de trabajar sobre estas materias, sucesivamente, en los laboratorios de Abderhalden en Halle a. d. Saale, de Rona en Berlín, de Herbst en Heidelberg y de Caullery en Francia, expreso aquí mi sincero reconocimiento a todos ellos por la cordial acogida y por la constante asistencia recibidas de su parte. Pero nada de esto me hubiera sido posible realizar sin la ayuda moral y material de la « Junta para Ampliación de estudios e Investigaciones científicas » que reside en Madrid ; aprovecho, pues, gustoso la ocasión de expresar aquí mi profundo agradecimiento hacia ella, y muy especialmente hacia el ponente de la sección de Ciencias, mi sabio profesor don Ignacio Bolívar, maestro de los naturalistas españoles de hoy día, cuyos acertados consejos y decidido apoyo han sido para mí de un valor inapreciable y decisivo.

Séame permitido también agradecer la ayuda recibida del distinguido químico español don Lucio Lascaray, que ha puesto a mi disposición amablemente, el caudal no común de sus conocimientos y su nutrida biblioteca, siempre que los he requerido.

José M.ª Susaeta

Station Zoologique de Wimereux (Pas de Calais).

ÍNDICE DE MATERIAS

PRIMERA PARTE

COLOIDES

CAPÍTULO I

Págs.

Características del estado coloidal 3

Métodos generales de obtención de coloides..... 3
Historia 3
¿Qué son coloides?..... 3
Sistemas dispersos o dispersoides. Su definición 10
Definición de los coloides..... 12
Procedimientos generales de obtención de coloides..... 14
Conclusiones de lo dicho en este capítulo..... 18

CAPÍTULO II

Caracteres ópticos y mecánicos de los coloides 20

Característica óptica del estado coloidal dentro de los sistemas dispersos..... 20
Consideraciones referentes a la relación que existe entre el grado de dispersión y estos fenómenos ópticos..... 22
Serie óptica según el grado de dispersión..... 23
El fenómeno de TYNDALL visto al microscopio 24
Movimiento browniano..... 27
Experiencias de PERRIN 28
Aplicaciones de estos hechos a la Biología y Medicina..... 28

CAPÍTULO III

Disociación electrolítica. — Osmosis. — Equilibrio de Donnan.... 31

I. **Historia y fundamentos de la electroquímica y de la teoría de la disociación** 31

II. **Presión osmótica, trabajo osmótico** 36
Aplicación de las leyes de los gases a las disoluciones diluídas 39
Trabajo osmótico 42
Explicaciones sobre lo que puede ser la presión osmótica 43

Equilibrio osmótico de Donnan..... 44
Diferentes casos y consecuencias..... 44

Aplicaciones biológicas de estos hechos..... 49
Diálisis compensada 50

CAPÍTULO IV

Págs.

Caracteres eléctricos de los coloides 51

Variabilidad de la carga eléctrica 53
Lo que entendemos por iones 53
Qué grado de dispersión tienen los iones 54
Explicación de los caracteres eléctricos de los coloides partiendo de estos conocimientos 56
Aplicaciones de estos conocimientos 58

CAPÍTULO V

Variaciones del estado coloidal 61

Denominaciones usuales 61
La viscosidad 63
Coagulación 75
Peptización 78
Aplicaciones biológicas de estos hechos 79
Fecundación del huevo 81
Importancia del hinchamiento por imbibición en Biología y Medicina. 82

CAPÍTULO VI

Tensión superficial de los líquidos. — Adsorción 87

Concepto práctico de la tensión superficial 87
Método capilar para la medida de la tensión superficial 90
Influencia de ciertas substancias sobre la tensión superficial del agua y su importancia 91
La adsorción y sus relaciones con la tensión superficial 92
Medida de la adsorción 94
El estado coloidal y los procesos adsortivos 95
Isoterma de la adsorción de FREUNDLICH 97
Teorías de la adsorción 97
Teorías físicas 98
Teorías eléctricas 98
Teorías químicas 99
Teoría de LANGMUIR. Ideas de HARKINS 100
Teorías mixtas de la adsorción 101

Importancia biológica de estos hechos 102
Inmunidad y adsorción 104
Tensión superficial y adsorción en terapéutica 106
Vitaminas y Físico-química 107

CAPÍTULO VII

Química coloidal de los albuminoides y de los lipoides 110

Algunas propiedades generales coloidales y químicas de los albuminoides, interesantes desde el punto de vista biológico 110
Propiedades anfóteras de las substancias albuminoideas 111
Propiedades coloidales de las soluciones de albuminoides 113
Consideraciones sobre el hinchamiento por imbibición de algunos albuminoides 115
Propiedades eléctricas de las soluciones de albuminoides 117
Explicación química de esta variación en la carga eléctrica de las micelas, sin recurrir a la adsorción de iones 118
Sobre la coagulación de los albuminoides 119
Coagulación llamada por el calor o sea de los albuminoides desnaturalizados 119
Coagulación de los albuminoides naturales o sea sin intervención del calor 120

Págs.

Sobre química coloidal de lipoides 122
Consideraciones sobre las emulsiones de los lipoides con el agua y acción sobre ellas de aniones y cationes 123

Aplicaciones biológicas de estos hechos 125
Teoría de la membrana lipoide de OVERTON 125
Hemolisis y citolisis 127
Inconvenientes de esta teoría considerada exclusivamente 128

CAPÍTULO VIII

Sobre concentración de iones H y de iones OH 132

Importancia especial de ambas especies de iones 132
Indicadores 137
Papel y funcionamiento de los reguladores (PUFFER de los alemanes). 138
Preparación de una solución que posea una cierta concentración previamente dada de iones H 140

Sobre la determinación de los iones H 141
Principio del método de determinación de iones H mediante indicadores, según SORENSEN (con reguladores) 141
Determinación de los H-iones sin reguladores 141
Causas del error con estos métodos 143
Método de WALPOL 144
Utilización de estos métodos en la práctica 145
Método electrométrico. — Sus fundamentos (Gaskettenmethode de los alemanes) 146
Principio del método 146
Medida del potencial 147

Bibliografía 153

SEGUNDA PARTE

FERMENTOS

CAPÍTULO I

Generalidades sobre los fermentos, sobre su obtención y sobre su estudio 157

Las orientaciones que se advierten entre los investigadores acerca del modo de obrar de los fermentos 157
Métodos generales de obtención de fermentos 159
Métodos generales de investigación de fermentos 163
Métodos de estudio de las fermentaciones en sí. Cinética de las fermentaciones 164

CAPÍTULO II

Ideas actuales sobre la acción fermentativa, catálisis y fermentación 171

I. Catálisis y fermentos en general 171

II. Analogías y diferencias entre catalizadores inorgánicos y fermentos, o sea pruebas en pro y en contra de la hipótesis que los considera análogos 189
Analogías 189
Diferencias aparentes entre fermentos y catalizadores inorgánicos. .. 191

III. Los fermentos como coloides 197

IV. Conclusiones 202

CAPÍTULO III

Págs.

Zimógenos. — Cofermentos. — Antifermentos. — Zimoides. — Otras teorías sobre fermentos 203

Zimógenos 203

Cofermentos 205

Antifermentos 207

Opinión de ABDERHALDEN sobre todos estos cuerpos. 209

Zimoides 209

Otras hipótesis y caminos propuestos para resolver el problema de los fermentos 210

CAPÍTULO IV

Los fermentos en el organismo 216

Hidrobasas 217

Descriptiva de diferentes fermentos 219

Glucosidasas 222

Esterasas y lipasas o hidrolasas actuando sobre grasas y grasas fosforadas 224

Hidrolasa actuando sobre albuminoides y sus productos de descomposición. 225

a) Proteasas 225

b) Peptasas 230

Fermentos especiales sobre albuminoides 231

Consideraciones generales sobre relaciones recíprocas, estructura, etc., de las hidrolasas 232

CAPÍTULO V

Fermentos oxidantes y reductores 236

Papel de estos fermentos en el organismo 243

APÉNDICE I

Algunas fórmulas para obtención de fermentos 259

APÉNDICE II

Breve resumen sobre la composición química de los principios inmediatos de los organismos 263

I. Hidratos de carbono 263

II. Grasas 266

III. Albuminoides 267

Amino-ácidos y polipéptidos 267

Bibliografía 274

Índice alfabético de autores 275

Índice alfabético 278

PRIMERA PARTE

COLOIDES

Capítulo I

Características del estado coloidal

Métodos generales de obtención de coloides [1]

Historia

La química de los coloides es una ciencia relativamente moderna. Ya a principios del siglo XIX aparecieron algunos trabajos del alemán Richter y del italiano F. Selmi sobre temas que hoy incluiríamos en la química coloidal, pero se puede decir que quedó oficialmente fundada, por decirlo así, sólo hace unos 50 años con los trabajos del inglés Tomás Graham. Durante bastante tiempo no se dió gran importancia a estos conocimientos, pero en cambio, en los últimos 15 años, los estudios sobre coloides han sido tan numerosos, las aplicaciones de estos conocimientos en otras ciencias, biología, medicina, química, etc., y en la industria van siendo tantas, y las reglas y leyes sobre coloides se van conociendo de tal modo, que hoy se puede decir que constituye una ciencia independiente, a cuyo avance contribuyen con sus estudios, numerosos investigadores de todos los países cultos. Siendo también muchos los libros y revistas que sólo se ocupan de esta materia.

¿Qué son coloides?

El concepto de *coloide* ha variado mucho en el curso del tiempo, y hoy difiere bastante del que se forjó Graham sobre este estado y del que se expone en los libros antiguos cuando hablan de coloides.

El nombre viene de *cola*, indudablemente por la analogía entre las propiedades de esta substancia y las de los primeros coloides que se estudiaron. Para definir el concepto actual de *coloide* iremos discutiendo opiniones que han existido o que pueden parecer lógicas a primera vista sobre el estado coloidal. Una cuestión que de un modo más o menos claro se planteó desde el principio, es la siguiente :

(1) En este capítulo, lo mismo que en la parte doctrinal de los capítulos II y V, seguimos el orden de exposición y lo fundamental de las ideas expuestas por Wo. Ostwald en su libro *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*.

¿Existe relación entre la complicación química de los cuerpos y el estado coloidal? Es fácil suponer que todas las substancias de gran complicación química son coloides y con frecuencia resulta cierta tal suposición; lo que ya es completamente falso es la proporción inversa, a saber, el estado coloidal indica estructura química complicada en la substancia que en tal forma se nos presenta. En estado coloidal se pueden presentar no sólo compuestos tan sencillos como la sal común, sino toda una serie de elementos; así se oye hablar frecuentemente de oro, plata, bismuto, azufre, carbón, etc., coloidales. Y por el contrario, los compuestos sintéticos de mayor complicación química obtenidos hasta hoy, es decir, las cadenas de polipéptidos de mayor peso molecular se pueden presentar perfectamente cristalinas y sin las características del estado coloidal. Así que se puede decir, categóricamente, que en general *no existe relación ninguna entre la constitución química y el estado coloidal.* Es decir, que no sucede aquí lo que es característico en el fenómeno de la radioactividad, la cual radica en elementos de gran peso atómico. Tampoco es hoy posible reunir en un índice o tabla, como se ha hecho para la radioactividad, todos los coloides conocidos. Tal intento se realizó hace años y su objeto era que nos sirviese de libro de consulta en el caso de que se nos ocurriese preguntar si tal substancia es un coloide o no lo es. Hoy el número de coloides conocidos es muy excesivo para que podamos reunirlos en un cuadro. Se conocen métodos con ayuda de los cuales toda una clase de substancias se puede hacer que adopten el estado coloidal, y no es como antes un resultado interesante de la experimentación en la química de los coloides el obtener uno nuevo. Con mucha frecuencia, una substancia según su concentración en el líquido en que está disuelta es coloide o no lo es, lo mismo sucede si variamos el disolvente, así, por ejemplo, el tanino es un coloide en el agua y no en el alcohol. Es decir, que repetiremos que la composición química de una substancia nada nos dice, en general, respecto a la naturaleza coloidal o no de la misma. El criterio químico no sirve, por lo tanto, si queremos utilizarlo para definir los coloides.

Vamos a pasar a hablar de los experimentos que sirvieron de base para originar el concepto de coloide, es decir, de **los primeros pasos de la química experimental coloidal.** Sabido es que si llenamos un tubo de ensayo hasta su mitad de una solución coloreada de una sal, y con mucho cuidado le añadimos agua, de tal modo que conservemos lo más claramente posible la capa de separación entre ambos líquidos, al cabo de algún tiempo de haber dejado ésta en perfecto reposo encontraremos la misma concentración de la sal en todo el tubo. La sal se *ha difundido* por igual en todo el líquido. Thomas Graham fué el primer investigador que se propuso realizar sistemáticamente, experiencias cuantitativas sobre **difusión.** Investigando desde este punto de vista las más variadas substancias, apreció desde luego que algunas de ellas en disolución ya fuesen ácidos, bases o sales, etc., poseían una velocidad de difusión considerable, al paso

que otras disoluciones, por ejemplo, de albuminoides, ácido silícico, hidróxido alumínico, etc., no eran difusibles, o lo eran muy lentamente. A estas últimas las llamó Graham soluciones coloides y este sencillo resultado fué el punto de partida de la ciencia que nos ocupa.

Es fácil comprender que semejantes experiencias con líquidos muy movibles, resultan muy difíciles de ejecutar; cualquier movimiento, cualquier corriente producida por diferencias de temperatura las invalida, y ya Graham procuró obviar este inconveniente utilizando gelatinas diluídas semisólidas en las que la velocidad de difusión es

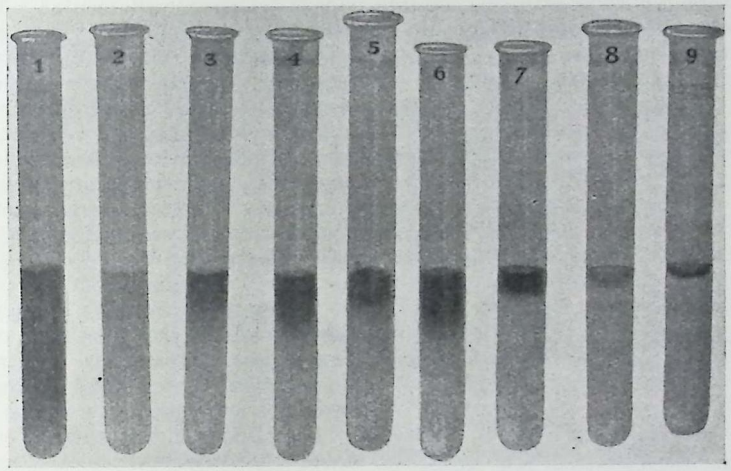


Fig. 1. Difusión de diferentes substancias en gelatina de agar al 2 %, al cabo de unos tres días. (Según Wo. Ostwald)

1. Acido pícrico
2. Nitrato de cobalto
3. Eosina 0,1 %
4. Ponzeau R. 0,1 %
5. Fucsina 0,1 %
6. Vesuvina 0,1 %
7. Safranina G. 0,1 %
8. Benzopurpurina 0,1 %
9. Rojo de Congo 0,1 %

(Nótese la diferencia entre los primeros, que son moleculares dispersos y los últimos que son coloidales. Estos apenas se difunden, aquéllos mucho).

aproximadamente igual a la obtenida en líquidos movibles. Hoy se repiten estas experiencias llenando la mitad de un tubo de ensayo con disoluciones de gelatina calientes al 3 %; al enfriarse se cuaja y se vierte encima la solución coloreada a investigar, sea sulfato de cobre, ácido pícrico, etc., y se ve día por día difundirse la solución coloreada a través de la masa de gelatina (fig. 1). Las soluciones coloidales como la de rojo de congo, no penetran casi en absoluto. De paso se debe advertir que esta sencilla experiencia presta a menudo admirables servicios para saber si una solución es coloidal o no.

Graham mejoró todavía el procedimiento, estudiando la difusión de una sal contenida en un saquito hecho de una membrana orgánica,

como vejiga de cerdo, papel-pergamino, etc., a través de esta misma membrana en el disolvente puro en el que había introducido el saquito. Llamó a esta experiencia **diálisis** (fig. 2) y observó que las sales fácilmente difusibles en el caso de líquidos libres, lo eran también a través del saquito dializador y las no difusibles no eran tampoco dializables, lo cual no puede asombrar fijándose en que la membrana orgánica, pergamino, etc., mojada e impregnada por el disolvente no es sino una fina capa de gelatina. Puede uno fabricarse fácilmente una de estas membranas, impregnando un papel filtro con una disolución de colodión y dejando en seguida que se evapore el disolvente.

Según todo esto, parece que podría decirse sencillamente: soluciones coloides son las que no son difusibles ni dializables; pero tal definición sería solamente experimental y, además, aunque basada en una propiedad muy importante de los coloides, no es suficiente para caracterizarlos con seguridad en todos los casos, como luego veremos; y sobre todo hemos hecho al definirlos una presunción teórica que no se puede dejar pasar sin discutirla. Nos referimos al

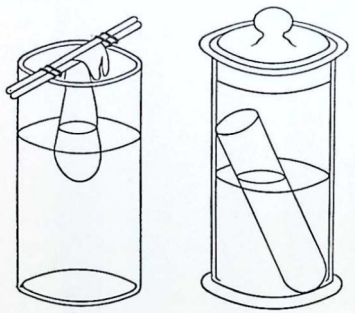


FIG. 2. Diálisis

A. Vejiga de un pez como dializador.
B. Saquito especial para diálisis, de papel pergamino

Concepto de solución que hemos aplicado sin más a los coloides. Pero, ¿qué entendemos nosotros por solución? Prescindiendo de toda idea que podemos tener respecto a relaciones químicas entre disolvente y substancia disuelta, lo que hemos admitido siempre como característico de la disolución es que la substancia disuelta se halla dividida molecularmente, cuyas moléculas se hallan, por decirlo así, nadando en el seno del disolvente. ¿Se puede aplicar esto para los coloides? ¿Existen aquí también moléculas separadas en el seno del disolvente? Muchos autores antiguos y también GRAHAM, así lo creían. Naturalmente aceptaban que debía existir una diferencia entre las moléculas de los coloides y de los no coloides, puesto que poseen aptitudes difusibles y dializables tan distintas. Y lo primero que puede uno figurarse para explicar estas divergencias es que las moléculas mismas poseen caracteres distintos según que sean coloides o no lo sean, asemejándose quizá esto algo a lo que sabemos que sucede con los estados llamados alotrópicos de un mismo cuerpo, como, por ejemplo, el azufre, que puede ser rómbico, exagonal, etcétera. De modo parecido debieron pensar GRAHAM y sus sucesores.

Aceptemos nosotros esta concepción, es decir, que tanto en soluciones coloidales como en las no coloidales, existen moléculas aisladas que se distinguen sólo por sus propiedades físicas. De hecho, hay que

advertir que existen grandes analogías entre ambas clases de soluciones; así nadie puede distinguir a simple vista una disolución de rojo de congo, de oro rojo o de azul de Prusia, etc., que son soluciones coloidales, de disoluciones típicamente moleculares como las de fucsina, sulfato de cobre, etc. Todas son igualmente transparentes y todas pasan con igual facilidad a través del papel filtro sea cualquiera su finura, así como a través de cualquier otro filtro de porcelana, arcilla, etc. Estas y otras analogías indican el gran parentesco entre las soluciones coloides y las que llamamos moleculares ordinariamente.

Todos los que han trabajado en análisis químicos, han aprendido al empezar, que el SH_2 precipitaba muchos metales, siendo negros los precipitados que con él dan la plata, el mercurio, el cobre, etc. y que no son sino sulfuros de los respectivos metales. Tales precipitados nadie duda que son substancias sólidas en suspensión, que se pueden separar por filtración, dejando un líquido completamente claro. Y sin embargo, en ciertas condiciones, tomando, por ejemplo, una disolución muy diluida de cianuro de mercurio y tratándola por SH_2 se produce indudablemente un precipitado SHg, puesto que el líquido se colorea de pardo obscuro, pero si queremos como en el primer caso, separar este precipitado por filtración, nos encontraremos con la desagradable sorpresa de que pasa a través del filtro y de que el líquido filtrado sigue siendo pardo obscuro. Este precipitado, sin embargo, es, como sabemos, una substancia sólida e insoluble en el agua, basta para convencernos de ello, que aumentemos un poco su concentración, o que sencillamente lo dejemos reposar para que efectivamente en este líquido pardo se separe por decantación el precipitado sólido.

Ahora bien; el líquido pardo obtenido tras la filtración es tan transparente a simple vista como una solución molecular, y si por otra parte realizamos con él experiencias de difusión o de diálisis, observaremos que se comporta como una típica solución coloide, es decir, que no se difunde nada en la gelatina, veremos también que esta solución transparente no es dializable y, por consiguiente, si la diálisis fuese el carácter clave de la disolución, diríamos que era una solución coloidal, siendo así que sabemos que no es sino un precipitado fino en suspensión. Finos precipitados en suspensión y coloides típicos coinciden, como se ve, en este aspecto de no ser dializables; no será, pues, suficiente para caracterizar a los últimos, este sólo aspecto de la no difusibilidad. Cabe en vista de este hecho preguntarse lo siguiente: ¿No serán los coloides otra cosa que precipitados muy finos? Quizá no sean más que *muy finas suspensiones de substancias insolubles*, es decir, lo que se llaman suspensiones mecánicas o emulsiones, como las que se pueden obtener frotando mucho o agitando en el seno de un líquido un sólido, como barro, etc., u otro líquido no miscible, respectivamente.

De estas relaciones entre soluciones ordinarias y coloides de una parte, y entre soluciones coloides y suspensiones mecánicas de

otra, nació una de las discusiones que más han apasionado en la historia de la química coloidal. Los unos querían colocar las soluciones coloides entre las ordinarias llamadas también moleculares o verdaderas y se oponían tenazmente a la opinión del otro partido, que señalaba la semejanza entre los coloides y las finas suspensiones originadas por división mecánica, como puede apreciarse en el siguiente esquema :

División mecánica — Coloides — Soluciones moleculares

Querían reunir estas dos escuelas a las tres clases citadas en dos grupos, como se ve en el esquema, y oponían cada una de ellas al grupo que formaban con dos, la clase que quedaba separada. Buscaban ambas tendencias un carácter definitivo que sirviese para definir los grupos que establecían. Los unos decían : las suspensiones y precipitados finos son turbios al paso que los coloides y las verdaderas soluciones son transparentes a simple vista. Pero los otros objetaban que FARADAY ya logró apreciar finos estados turbios inapreciables hasta entonces mediante una iluminación que TYNDALL perfeccionó y que produce el fenómeno que lleva su nombre.

(Este hacía pasar un cono de luz a través de una solución coloidal sobre un fondo obscuro, y así se ve el camino de la luz a través de la solución, lo mismo que se ve la marcha de los rayos del sol que penetran por un orificio en una habitación obscura por la iluminación del polvillo que flota en el aire.) Esto demostraba que en las soluciones coloidales debe haber finas partículas flotantes. Para la segunda escuela, los coloides se parecían, por lo tanto, a los precipitados en suspensión y no a las verdaderas soluciones que no dan el fenómeno de TYNDALL. Por otra parte, los partidarios de la teoría de la homogeneidad de los coloides, es decir, de su homología con las soluciones verdaderas, replicaban que si las soluciones coloidales no son homogéneas debían verse sus partículas al microscopio, y tal no sucedía.

Es curioso hacer resaltar aquí que fué precisamente uno de los representantes de esta última teoría, R. ZSIGMONDY, el que la echó abajo al inventar el ultramicroscopio mediante el cual *vió por primera vez las partículas coloidales.*

Lo más notable es que con este hecho, la discusión acerca de la clasificación analítica de los tres estados citados, no se resolvió ni se ha resuelto hasta la fecha, porque la química coloidal moderna nos ha enseñado *que no hay ninguna línea de separación bien definida entre las típicas suspensiones, el estado coloidal y las soluciones moleculares,* sino que por el contrario, *existen continuamente pasos de transición tanto entre las divisiones mecánicas y las soluciones coloidales de un lado como entre éstas y las verdaderas soluciones del otro.* Se ha reconocido que es más oportuno y fructífero que establecer el dualismo antiguo el considerar los tres estados desde el mismo punto de vista, el apreciar sus caracteres comunes y luego detenerse en descubrir las particularidades de cada uno de estos tres estados.

Este es, quizá, el resultado más importante de la química coloidal que la experiencia ha confirmado muchísimas veces. Es interesante establecer en seguida, por lo tanto.

Los caracteres comunes de los precipitados en suspensión de las soluciones coloidales y de las moleculares. En los tres estados varían las propiedades físicas y químicas periódicamente en el espacio. Para aclarar esto supongamos que tenemos una suspensión de granitos de cuarzo en agua (fig. 3). Si midiésemos con algún instrumento las variaciones del coeficiente de refracción de los distintos puntos de una recta que atraviesa la suspensión y representamos gráficamente tal variación encontraríamos una curva de la forma (fig. 4). El coeficiente de refracción tendría un valor en el líquido, al encontrar la recta un granito de cuarzo se elevaría ese valor, adquiriría otra vez el primitivo al entrar otra vez la recta en el líquido, nuevo aumento al encontrar otro granito de cuarzo igual al anterior, y así variarán periódicamente no sólo este valor, sino todas las propiedades físicas y químicas en todas las direcciones del espacio. Esta característica de la discontinuidad periódica de las propiedades en el espacio existe sin

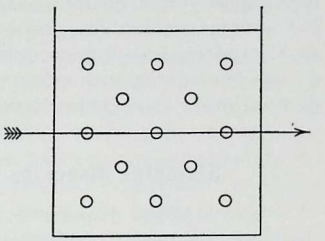


FIG. 3. Representación esquemática de los sistemas dispersos. (Imitación de Wo. OSTWALD)

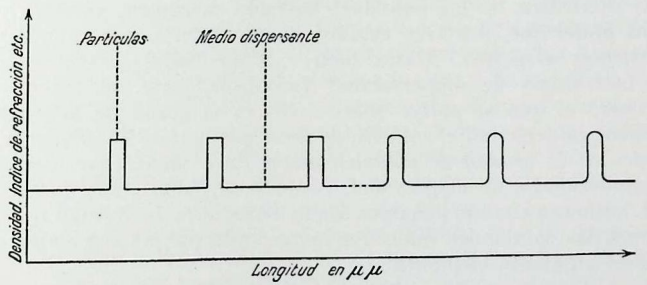


FIG. 4. Representación esquemática de los sistemas dispersos. (Imitación de Wo. OSTWALD)

duda en las soluciones moleculares. Es evidente que las propiedades químicas eléctricas, etc., varían en estas soluciones con periodicidad, en un punto tendrán las características propias del disolvente, en otros las del disuelto, es decir, las de las moléculas de éste posiblemente unidas al líquido en cuyo seno están. En una disolución diluída de cloruro sódico, por ejemplo, encontraremos periódicamente en el

espacio, iones positivos y negativos de Na y de Cl, así como otras propiedades físicas y químicas varían del mismo modo.

Solamente en este caso las variaciones periódicas tienen lugar en espacios reducidísimos, es decir, en las dimensiones que llamamos moleculares. Tales variaciones periódicas existen, como es natural, también en las soluciones coloidales, lo mismo que en las suspensiones mecánicas y que en las soluciones moleculares. Resumiendo : *en los tres estados varían las propiedades físicas y químicas periódicamente en el espacio.* La química coloidal ha establecido como punto central de sus consideraciones esta propiedad común de los tres estados, que denomina de estructura dispersa o mejor.

Sistemas dispersos o dispersoides. Su definición

Será sistema disperso todo producto o porción de materia cuyas propiedades varíen periódicamente en el espacio. Conviene no confundir este concepto con el que expresan los físico-químicos, cuando hablan de productos con varias fases o *heterogéneos* y de productos o sistemas *homogéneos* ; ejemplo de los primeros sería una suspensión de un sólido en el seno de un líquido en la que hay evidentemente fase sólida y otra líquida ; y de sistema homogéneo sería un ejemplo una disolución molecular. En cambio, ambos serían sistemas dispersos cuyo concepto, como se ve, es más extenso por abarcar los sistemas homogéneos y los heterogéneos, debido a que no hace distinción sobre la clase ni el número de propiedades que varían.

Vemos cómo desaparece todo motivo de discusión sobre la agrupación dualística de los coloides. **División mecánica, coloides y dispersión molecular,** son tres estados de la materia que coinciden en ser *sistemas dispersos.* Ahora bien; ¿cómo distinguiremos entre sí estas tres clases de dispersoides? Indudablemente, el criterio más lógico será el que se apoye sobre todo en el grado de la variación periódica, es decir, en el *número de veces que varían las diferentes propiedades en la unidad de volumen dada.* Es evidente que este grado de periodicidad o de *dispersidad,* como se le llama en la química coloidal, aumenta cuando pasamos desde los estados de división mecánica grosera a las soluciones moleculares pasando por las coloidales, como indica el siguiente esquema :

Sistemas dispersos

División mecánica grosera — Coloides — Soluciones moleculares

» ——————————→

aumento del grado de dispersidad

Suponiendo, pues, la misma cantidad de materia en la unidad de volumen y en los tres estados, encontraremos que en el sistema molecular la materia hállase en su límite extremo de división y, por lo tanto, apreciaremos el número máximo de variaciones de las propiedades físicas y químicas en la unidad dada; en la división mecánica, por el contrario, encontraremos el mínimo de variación. Los sistemas moleculares son los sistemas más altamente dispersos, menos dispersoides serán los coloides y, por último, los de menos grado de dispersidad serán los correspondientes a la división mecánica. Es preciso observar que no habiendo motivo alguno para que haya saltos en el grado de dispersión entre estos tres estados, se deben encontrar teóricamente todos los tránsitos posibles entre ellos, y la experiencia confirma, en efecto, que *existen efectivamente sistemas dispersos en todos los grados posibles de dispersión dentro de los límites extremos indicados.* De hecho se pueden citar muchos ejemplos de series continuas de dispersión. Así, el azufre es fácil prepararlo en diferentes tránsitos de división o dispersidad, desde el cristal de azufre grande que representa el grado más grosero, luego puede prepararse en forma de cristalitos, ya difícilmente visibles a simple vista o en forma de flor de azufre cuyos cristales sólo son visibles al microscopio, luego en preparados lechosos coloidales en agua como medio de dispersión cuyas partículas son ya invisibles al microscopio, o preparados coloidales en benzol ya apenas turbio, y por fin, puede presentarse en el grado de dispersión molecular representado por una disolución de azufre en el sulfuro de carbono. Cualquier otra substancia puede concebirse en todos estos estados ; así, la misma sal común puede estar en cristales, molida, coloidal o disuelta.

Habiendo una serie continua de dispersoides, se comprende que no se pueda decir teóricamente, cual es el valor de la dispersión característica para cada una de las tres clases ni en qué punto de la serie trazaremos la línea de separación entre ellas. Sin embargo, la práctica ha enseñado que ciertos valores son los más apropiados para establecer estos **límites de los diferentes dispersoides.** La línea de separación práctica entre la dispersión grosera y la coloidal se desprende del poder resolvente del microscopio. Según la teoría de la visión microscópica, sabemos que nunca podremos ver partículas menores que la mitad del valor de la longitud de onda de la luz. Utilizando radiaciones ultravioletas o sea las de menor longitud de onda y con métodos apropiados con objeto de obtener el extremo poder resolvente en la figura microscópica, se deduce que tal poder llega hasta la resolución de tamaños de 0,1 de micra (0,1 μ). Este es el valor que se utiliza desde luego arbitrariamente, para *límite entre dispersión grosera y sistemas coloidales.* También otros métodos de investigación aconsejan tomar el mismo valor. Así, el papel filtro endurecido, más fino, N.° 602, de SCHLEICHER y SCHÜLL, tiene poros de diámetro = 0,1 μ, las bujías filtros de arcilla o de porcelana los tienen de 0,2 μ á 0,4 μ. Es decir, del mismo tamaño, próximamente, que el poder resolvente del microscopio. Los coloides pasarán, pues, a través de tales filtros, al paso que las partículas de los sistemas grosero-dispersos por ser mayores que 0,1 μ quedarán retenidos por ellos.

Para establecer el límite entre los coloides y los moleculares dispersos, fijémonos en las dimensiones de la molécula, calculada por físicos y químicos. Estos nos dan valores comprendidos entre una décima de millónésima de milímetro (0,1 $\mu\mu$) y una millonésima de milímetro (1 $\mu\mu$) para moléculas típicas.

Para las moléculas grandes como, por ejemplo, el almidón, se admite un diámetro de 5 $\mu\mu$, y como se sabe que la disolución del almidón en agua presenta ya caracteres de coloide, se ve que este valor entra ya en el terreno del sistema coloidal. Además, el poder resolvente de otros procedimientos ópticos, que luego detallaremos, llega hasta 1 $\mu\mu$. *Así que se ha admitido este valor (una millonésima de milímetro) como límite (desde luego también arbitrario) entre los coloides y la dispersión molecular.* Se pueden resumir estas ideas en el siguiente cuadro :

Sistemas dispersos

Dispersiones groseras	Coloides	Dispersión molecular
» aumento del grado de dispersión →		
Tamaño del período es $> 0{,}1\,\mu$; no atraviesan el papel filtro ; el microscopio nos puede dar su imagen (1)	Su tamaño $0{,}1\,\mu$ a $1\,\mu\mu$ atraviesan el papel filtro ; no son visibles al microscopio, no son difusibles ni dializables.	Período $< 1\,\mu\mu$ atraviesan el papel filtro no son visibles al microscopio, pero sí son difusibles y dializables

Ahora es cuando se puede dar la

Definición de los coloides

Según nos enseña la química coloidal pertenecen los coloides junto con los estados de división mecánica y las soluciones moleculares a los llamados sistemas dispersos. Se diferencian de ellos por el valor de su grado de dispersión que varía típicamente entre la diezmilésima y la millonésima de milímetro. Esta sería la definición teórica. Prácticamente se diferencian los coloides de los otros estados por los caracteres indicados en el esquema. No debiendo olvidar añadir que existen todos los grados posibles de paso entre coloides y sistemas de dispersión grosera de una parte, y entre coloides y soluciones moleculares de otra.

Los coloides representan, por lo tanto, un territorio limitado sólo por razones prácticas en la serie continua de los sistemas dispersos. Se comprende que de estas consideraciones se haya deducido en seguida la posibilidad teórica de que todas las substancias, pudiendo adquirir todos los grados de dispersión posibles, puedan, por lo tanto, presentarse en estado coloidal, y la experiencia ha confirmado esta con-

(1) K. Zsigmondy, coloca el límite entre los coloides y los sistemas de dispersión grosera o verdaderas suspensiones un poco más alto que Wo. Ostwald, es decir, en 0,2 μ (K. Zsigmondy, *Kolloidchemie*, pág. 26, 4.ª ed.).

clusión infinidad de veces, por lo cual se puede decir, con el investigador ruso P. P. von Weimarn, que el *estado coloidal es un estado general posible de la materia.*

Al hablar de los sistemas dispersos no hemos tenido hasta ahora en cuenta el estado físico del medio dispersante ni del disperso, pero es evidente que caben todas las combinaciones posibles, es decir, que lo disperso puede ser sólido y el medio dispersante líquido o viceversa, etc., de tal modo que llamando *S*, *L* y *G* a los estados sólido, líquido y gaseoso y señalando con mayúscula y en primer lugar la fase dispersa, y con minúscula y en segundo lugar la dispersante, las combinaciones posibles serán :

$S + s$	$S + l$ (suspensoides)	$S +$ Gas (humo)
$L + s$	$L + l$ (emulsoides)	$L +$ Gas (niebla)
$G + s$	$G + l$ (espuma)	

En cada clase podrá haber dispersión grosera, coloidal y molecular. En la Naturaleza hay ejemplos de todas las combinaciones citadas, pero es claro que los más abundantes son los dos, sólido en líquido y líquido en líquido o sean los suspensoides y los emulsoides en general, que son el objeto principal de la química coloidal. Se habrá advertido que falta la combinación $G + g$ o sea gas en gas, que la naturaleza misma de este estado impide.

Como acabamos de decir que las combinaciones $S + l$ y $L + l$ son el principal objeto de la química coloidal, parece oportuno detenerse a considerarlas. Si nosotros agitamos barro de diatomeas en agua obtendremos una suspensión de los pequeños caparazones que son partículas sólidas en el agua movida ; si obtenemos, como diremos luego, oro en estado coloidal, como quiera que el oro es sólido a la temperatura ordinaria tendremos que admitir que se trata de partículas *sólidas* de tamaño coloidal flotando en el agua, es lo que se llama un suspensoide propiamente, se diferencia, como se ve, de la suspensión por el tamaño de las partículas únicamente. Por consiguiente, resumiendo, diremos : Partículas sólidas de dispersión grosera flotando en un líquido, forman una *suspensión* ; partículas sólidas de tamaño coloidal flotando en un líquido, forman un *suspensoide.*

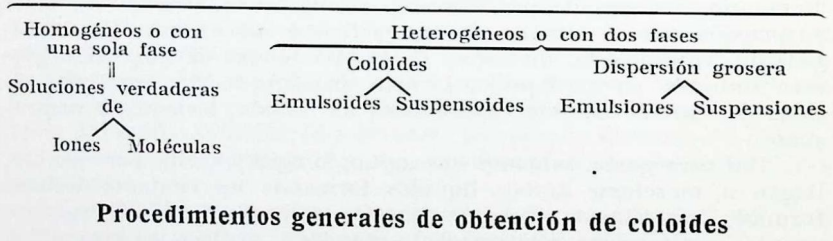
Por otra parte, sabemos que agitando agua y aceite, por ejemplo, llegan a mezclarse ambos líquidos formando un conjunto lechoso formado de gotitas de aceite interpuestas en el agua *(emulsión)* siempre que las gotitas sean relativamente grandes y visibles, en general, al microscopio; si, como sucede en la leche, la grasa estuviese muchísimo más dividida se necesitarían mayores aumentos para verla, sería una emulsión más fina, y llegando a más la división, podríamos obtener partículas de tamaño coloidal líquidas en agua u otro dispersante líquido; son los **emulsoides.** Estos son los coloides más conocidos, por ejemplo: son las disoluciones de gelatina, agar, mucus, albuminoides, etc.

Se debe advertir que estos últimos, por la enorme complejidad y tamaño de su molécula se admite, como diremos más tarde, que *una sola* tiene ya tamaño suficiente para ser coloidal, es decir, aquí la dispersión molecular y la coloidal se confunden, no pueden tener tamaño menor, pues su molécula se rompería y dejaría de ser el albuminoide dado, son, por decirlo así, coloides «per se» y OSTWALD ha propuesto para estos casos el nombre de **eucoloides.**

La distinción de emulsoides y suspensoides se impone además desde el punto de vista práctico, pues poseen cualidades bastante diferentes; aquéllos son en general *liófilos*, es decir, tienen tendencia a rodearse o embeberse del líquido dispersante (si es agua se diría que son *hidrófilos*), los segundos, en general, ofrecen una transición brusca en el paso de su fase sólida a la líquida del dispersante, no se rodean de ella, son *liófobos* o *hidrófobos*. Este carácter hace que presenten diferencias notables en su comportamiento frente a agentes exteriores, como se verá al hablar luego de diferentes fenómenos coloidales, como adsorción, coagulación, etc.

En la dispersión llamada molecular nos enseña la química clásica que hay dos grados; existen substancias, como el azúcar, que al disolverse en el agua no comunica a ésta la facultad de la conductibilidad eléctrica; las sales, por el contrario, en general, sí. Se supone que es que aquél al disolverse conserva sus moléculas *no disociadas*, éstas, en cambio, se admite que se separan en partículas conductoras de la electricidad llamadas *iones*. Con mucha frecuencia se designa con el nombre de un *sistema homogéneo* o de una *sola fase* a las disoluciones verdaderas, sean iónicas o moleculares; así, que más que todo, desde el punto de vista práctico, se suele hacer la siguiente división con los dispersoides.

Cuadro general de los dispersoides



Procedimientos generales de obtención de coloides

Los esquemas dados sobre los sistemas dispersos permiten indicar, desde luego, que habrá dos caminos para hacer que una substancia tome el estado coloidal, y que todos los métodos podrán agruparse racionalmente en estos dos modos, a saber: o parte uno del estado de dispersión grosera de la substancia dada y eleva su grado de dispersión hasta que las partículas adquieran las dimensiones del estado coloidal, camino que encierra los **métodos llamados de dispersión;** o empieza uno, inversamente, con el sistema molecular de la misma substancia y hace que sus moléculas, por decirlo así, «crezcan» hasta que adquieran el tamaño característico del estado coloidal agrupándose estos procedimientos en los que se llaman en general **métodos por condensación.** El «crecimiento» molecular se entiende en el sentido de hacer que se agreguen, que se reúnan, que se condensen, etc., entre sí las moléculas.

Es fácil comprender que se podrán utilizar las diferentes clases de energía, mecánica, química, eléctrica, hasta el calor, luz, etc., para dispersar una substancia o para condensar sus moléculas; pero aquí citaremos sólo dos ejemplos, uno químico, de condensación, y otro eléctrico, de dispersión, entre los cientos de procedimientos que existen dentro de los dos caminos indicados.

Obtención de coloides por condensación química. Los alquimistas conocían ya el oro coloidal, que lo preparaban *reduciendo* sales de oro por medio de toda clase de substancias orgánicas, por ejemplo, con orina y le llamaban «Aurum potabile» sin que sepamos porqué. Ha sido objeto de estudio para muchos investigadores como RICHTER, FARADAY, etc., y es un coloide muy interesante que se presenta como un líquido de color rojo intenso, violeta o azul según el grado de dispersión. Partiendo, pues, de la solución molecular, o mejor dicho, de la dispersión iónica de cloruro de oro, empezaremos por neutralizarla contra papel tornasol por medio de bicarbonato sódico. Después, sólo será necesario reducir la sal de oro para convertirla en oro metálico, teniendo cuidado de que el precipitado de este metal que se forme, esté tan altamente disperso que no pase de las dimensiones características del estado coloide. Con este fin se pueden utilizar muchas substancias orgánicas, pero sólo con grandes precauciones y ocasionalmente se obtiene el puro oro rojo coloidal, la mayoría de las veces se obtiene el violeta, azul... W. OSTWALD recomienda como procedimiento más seguro para obtener oro coloidal rojo el siguiente: Se vierte en un pequeño frasco de ERLENMEYER, aproximadamente, 100 cm.^{3} de agua destilada y sobre ella unas gotas de una solución neutralizada al 1 % de cloruro de oro, se agita y se añade luego algunas gotas de una disolución muy diluída de tanino en agua (0,1 % aproximadamente). No importan las proporciones de lo mezclado, lo interesante es que no haya demasiado cloruro de oro ni de tanino, de tal modo que una vez verificada la mezcla resulte prácticamente incolora. Se calienta uno o dos minutos, moviéndola continuamente sobre el mechero BUNSEN y aun antes de hervir adquiere color rojo cereza. Se puede añadir, sin miedo, más cloruro de oro, o si fuere necesario más tanino, y después de volver a calentar veremos que la solución adquiere una coloración rojo obscura. Por lo demás, resulta frecuentemente la experiencia aun con agua ordinaria. Si añadiésemos a la solución diluída y neutra de cloruro de oro, otra diluída de clorhidrato de fenilhidrazina, se obtendría casi ins-

Demostración de la ley de WEIMARN
(Influencia de la concentración sobre el grado de dispersidad del precipitado)
$B_a(CNS)_2 + M_nSO_4 = B_aSO_4 + M_n(CNS)_2$
(Según P. P. von WEIMARN) (tomado de OSTWALD)
(aumento 1 : 1500)

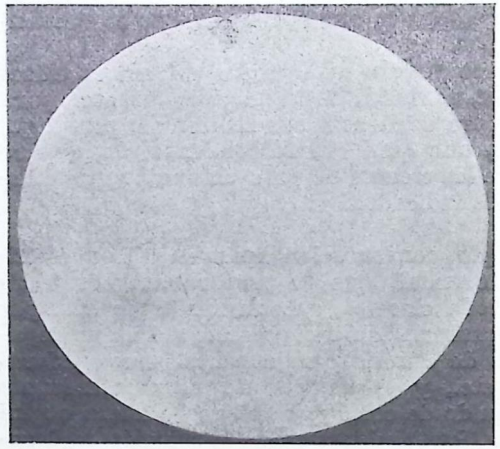


FIG. 5 A
Concentración aproximada $\frac{n}{2000}$
(precipitado coloidal)

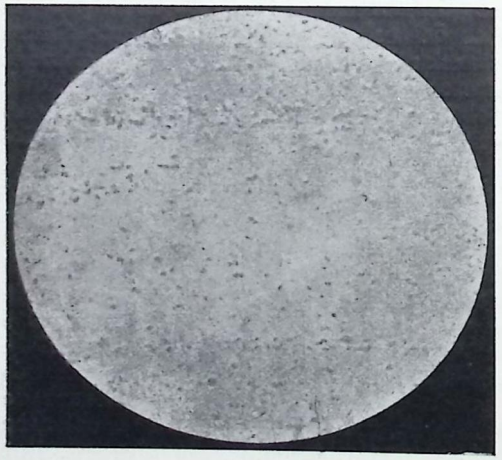


FIG. 5 B
Concentración aproximada $\frac{n}{1000}$
(las partículas son ya visibles)

tantáneamente oro coloidal azul, si se añadió bastante reductor; añadiendo demasiado poco, la coloración es violeta. Si las soluciones fuesen concentradas los colores del oro serían azul obscuro y verde obscuro, respectivamente, pero ya no sería coloide, sino que precipitaría en forma de particulitas microscópicas. En estos ejemplos se ha visto que se parte de sistemas dispersos (soluciones verdaderas de cloruro de oro); por los reductores se consigue que queden libres las moléculas de oro y después provocamos la unión entre sí de ellas, formando complejos mayores, eligiendo, como es natural, las condiciones en que esta agrupación se detiene al llegar al tamaño coloidal sin pasar a dimensiones mayores que conducirían a la precipitación. Vamos a hablar de cuáles son esas condiciones que nos conducirán al fin apetecido. En el ejemplo descrito y en el antes citado del sulfuro de mercurio coloidal, hemos partido de soluciones extraordinariamente diluídas, de manera que ya vemos que debe existir una relación entre el grado de dispersión del precipitado y la concentración de las soluciones que reaccionan. La ley que regula esta relación vamos a indicarla tras del ejemplo

siguiente: Se toman dos soluciones muy diluídas de cloruro de hierro y de ferrocianuro potásico y se reúnen, como se sabe, adquiere el líquido un color azul llamado de Prusia, este líquido es de hecho una solución coloidal de gran dispersión, pero a simple vista, completamente transparente. Si las disoluciones primitivas de ambos fuesen más concentradas, se formaría entonces un precipitado azul obscuro que se sedimentaría, quedando encima un líquido débilmente coloreado. Si, por fin, tomásemos dos soluciones todavía más concentradas, es decir, ya prácticamente saturadas de las dos substancias y las reuniésemos revolviéndolas con una varilla de vidrio se observaría que los dos líquidos se cuajan, se hacen caseosos hasta el extremo de poder volver el tubo sin que se vierta el contenido, advirtiendo que los dos líquidos originarios eran muy flúidos. Si diluímos un poco de este coágulo en un volumen mayor de agua destilada se forma otra vez un líquido azul estable que es un coloide, como lo demuestra el hecho de que atraviesa el papel filtro. Se ve, por lo tanto, que tomando soluciones extremadamente concentradas, las partículas se han hecho menores, pues poseen

Demostración de la ley de WEIMARN
(Influencia de la concentración sobre el grado de dispersidad del precipitado)
$B_a(CNS)_2 + M_nSO_4 = B_aSO_4 + M_n(CNS)_2$
(Según P. P. von WEIMARN) (tomado de OSTWALD)
(aumento 1 : 1500)

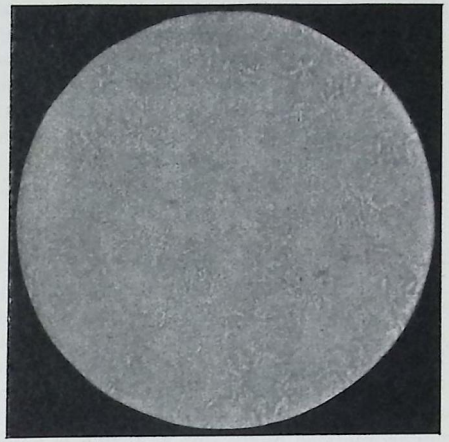


FIG. 5 C
Concentración aproximada $\frac{n}{20} - \frac{n}{10}$
(las partículas adquieren su tamaño máximo)

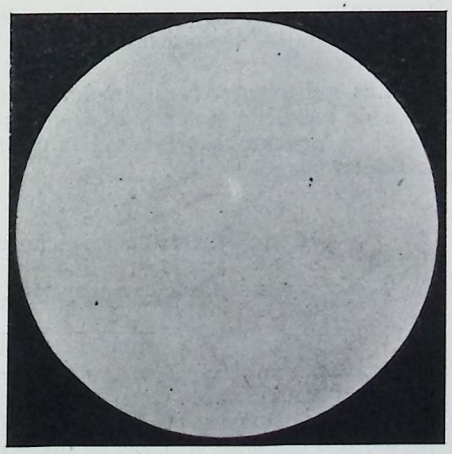


FIG. 5 D
3-7 veces la normal (otra vez precipitado coloidal)

tamaño coloidal, al paso que el precipitado característico de la dispersión grosera lo obtuvimos al elegir concentraciones medias de los líquidos reaccionantes. Resumiendo : con grandes concentraciones o con muy pequeñas obtenemos un grado de dispersión muy grande y con concentración intermedia obtenemos una dispersión mucho menor. **Esta ley se conoce con el nombre de su descubridor el químico ruso Weimarn.** Se ha podido comprobar también esta ley mediante microfotografías de diferentes precipitados de una substancia producida con soluciones de diferente concentración, apreciándose bien por este medio el aumento y disminución de las partículas (fig. 5).

Ostwald advierte que es curioso que las recetas clásicas alemanas para obtener coloides parten casi solamente de soluciones diluídas al paso que el investigador americano Carey Lea ha trabajado casi siempre con las concentradas.

Ejemplo de un procedimiento eléctrico de dispersión. Para ello puede repetirse la denominada pulverización eléctrica de metales de Bredig. Basta hacer pasar una corriente continua de 5-8 amperios (1) entre las puntas de dos hilos de plata sumergidos en agua destilada que se ha hecho alcalina mediante la adición de porciones minimales de bicarbonato sódico. Una vez lanzada la corriente se regula la distancia entre las puntas mediante un tornillo micrométrico hasta que se forme el arco. Aparecen nubes pardo obscuras o verdosas a partir del punto de la descarga que se esparcen flotando en el agua. Son nubes de plata coloidal transparente a simple vista y que atraviesa el filtro. Especialmente Swedberg ha obtenido, partiendo de metales alcalinos, hermosas soluciones coloreadas coloidales, utilizando para su dispersión medios especiales (descargas eléctricas oscilantes, temperaturas bajas y medios de dispersión orgánicos).

Las radiaciones, por ejemplo, de la luz ultravioleta sobre una placa de metal, la fusión y la rápida inmersión en agua y hasta el simple frotamiento de polvos se han utilizado para obtener preparados coloidales por dispersión.

Conclusiones de lo dicho en este capítulo

Los coloides son sistemas dispersos, cuyo grado de dispersión en los casos típicos está entre $\frac{1}{10{,}000}$ y $\frac{1}{1.000{,}000}$ de milímetro. Se diferencian de los otros sistemas dispersos prácticamente en que no son difusibles ni dializables como lo son los dispersos moleculares, pero que por otro lado no se pueden ver con el microscopio, ni son retenidos por el filtro como los sistemas de dispersión grosera. Existen todos los

(1) Esto se consigue fácilmente tomando la ordinaria urbana y transformándola por medio de un reóstato.

tránsitos posibles entre coloides y soluciones moleculares de un lado y entre coloides y sistemas de dispersión grosera. El estado coloidal es un estado general posible de la materia, y toda substancia puede, fundamentalmente, ser llevada a él. Esto se puede llevar a cabo por medio de métodos de dispersión si partimos de substancias no o groseramente dispersas, o por métodos de condensación si partimos del estado de dispersión molecular. No solamente medios químicos, sino la energía eléctrica, mecánica y otras pueden utilizarse con el fin de verificar dispersiones o concentraciones de coloides.

Capítulo II

Caracteres ópticos y mecánicos de los coloides

Característica óptica del estado coloidal dentro de los sistemas dispersos

Los caracteres ópticos nos sirven, junto con la diálisis, mejor, quizá, que cualquier otro procedimiento para distinguir prácticamente las soluciones coloidales de las soluciones denominadas verdaderas o moleculares; por eso debemos detenernos en el estudio de estos fenómenos ya que son éstas dos clases dentro de los sistemas dispersos, los más difíciles de distinguir en general. Los sistemas de dispersión grosera son como se vió en el primer capítulo, más fácilmente diferenciables.

Cuando tenemos dos tubos de ensayo, el uno con una solución molecular y el otro con una coloidal, puede ocurrir que ambas se presenten perfectamente claras y transparentes, de tal modo, que a simple vista sería difícil distinguirlas. Si observásemos ya algún enturbiamiento se debe sospechar que la solución que lo posee es coloidal (si hemos excluído la posibilidad de que se tratase de una suspensión mecánica). El enturbiamiento se aprecia mucho mejor si colocamos los tubos contra un fondo obscuro (papel negro o mejor un tejido obscuro), y es debido tal enturbiamiento a que los rayos de luz que atraviesan la solución encuentran medios de diferente refringencia, cuando pasan del medio dispersante y tropiezan con una partícula del disperso, entonces se refractan, reflejan y, en general, cambian de dirección originándose con ello la pérdida de la absoluta transparencia del líquido. Basándose este fenómeno en diferencias de refringencia entre el dispersante y las partículas del disperso, si tal diferencia fuese pequeña desaparecería aquél, y en efecto no es apreciable en las soluciones coloidales de albuminoides como lo es el plasma sanguíneo, y en general en las de los coloides denominados *emulsoides* o hidrófilos, cuyas partículas están embebidas o rodeadas de una envoltura del medio dispersante. Presentan, en cambio, este fenómeno más típicamente los coloides que hemos llamado hidrófobos o *suspensoides*, como la plata coloidal, etc.

Faraday empleó ya este procedimiento de la iluminación lateral de las soluciones colocadas sobre un fondo obscuro, para apreciar grados finos de enturbiamiento, pero lo mejoró y lo empleó mucho más J. Tyndall, y por esto se conoce con el nombre de **fenómeno de Tyndall** (fig. 6). El mejor modo de apreciarlo es formar un cono de luz por medio de un foco luminoso y un medio reflector o una lente y proyectarlo sobre la solución, de modo que una parte de ella quede iluminada. Si la solución fuese molecular apreciaríamos su perfecta transparencia; en cambio, si fuese coloidal las partículas se iluminarían, como se ilumina el polvillo atmosférico cuando dejamos entrar en un cuarto obscuro un haz luminoso, y el cono al atravesar la solución adquiriría una claridad especial denunciadora de los más finos enturbiamientos. Según que las soluciones no presenten, o que si presentan el fenómeno de Tyndall se llaman *ópticamente vacías* o no, por eso se habla en los libros de química coloidal sobre la obtención y conservación de agua ópticamente vacía, etcétera, ya que este fenómeno es tan delicado que es apreciable en el agua ordinaria aunque muy débilmente, debido a las finísimas partículas de polvo o burbujitas de gas que contiene.

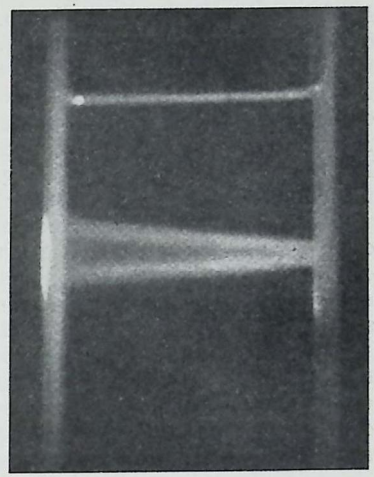


Fig. 6. Fenómeno de Tyndall. (Según Wo. Ostwald)

La mayoría de los coloides típicos presentan el fenómeno de Tyndall aunque hay que advertir, como decíamos para el enturbiamiento, que los coloides hidrófilos como son las soluciones de albuminoides, lo dan muy débilmente por la falta de diferencia de refringencia entre dispersante y disperso. Pierde, pues, interés en biología este medio exploratorio, porque la mayoría de los coloides orgánicos son hidrófilos y sería grave error deducir sin más, de la debilidad con que una solución da este fenómeno o de su falta, la conclusión de que tal solución no es coloidal.

Se debe advertir también que no hay que confundir el fenómeno de Tyndall con el de la *Fluorescencia*. Muchas soluciones, sobre todo de colorantes y alcaloides, se iluminan al ser atravesadas por un haz luminoso sin ser coloidales. Prácticamente se diferencian ambos fenómenos mirándolos a través de un nicol, es decir de un analizador de luz polarizada, como la luz del fenómeno de Tyndall lo es, al mirar su cono al través del nicol que haremos girar, aparecerá y desapare-

cerá según el ángulo de giro la luminosidad del cono de TYNDALL; en cambio, la luz debida a la fluorescencia permanece constante e independiente del ángulo de giro del nicol a cuyo través la observamos.

Consideraciones referentes a la relación que existe entre el grado de dispersión y estos fenómenos ópticos

Consideremos, para empezar, el fenómeno del enturbiamiento. En los sistemas de dispersión grosera obedece, como hemos dicho, sobre todo a refracción y reflexión de la luz en las partículas dispersas. Pero si éstas se hacen más pequeñas hasta adquirir el tamaño coloidal, como, según definición, las partículas coloides son menores que la mitad del valor de la longitud de onda de la luz, no podrán ya ocasionar fenómenos de refracción, sino que darán *espectros de difusión*, desviarán la luz que a ellos llega esparciéndola en todo su alrededor. Si estudiamos en este caso el fenómeno de TYNDALL utilizando la luz blanca, como los rayos de longitud de onda menor (azul, violeta, ultravioleta) serán los que más se desvíen, al paso que el amarillo, rojo, etc., apenas sufren desviación ninguna, resultará un juego de colores característico de muchísimos coloides denominado *opalescencia*. Muchas soluciones coloidales, minerales, etc., la presentan, pero el ejemplo más grandioso de ella lo tenemos en los juegos de luz que se observan a la salida y puesta del sol. Entonces la luz blanca de éste al encontrarse con el sistema de gran dispersión que representa nuestra atmósfera, sufre en sus partículas finísimas desviaciones de diferente valor, según la longitud de onda del color correspondiente, descomponiéndose, por lo tanto, antes de llegar a nosotros. Si afinando el método de TYNDALL, utilizamos algún medio de apreciar desviaciones en los rayos de menor longitud de onda, es decir, en los ultravioleta, llegaremos a poder denunciar la presencia de obstáculos extremadamente finos como son las moléculas y partículas de los sistemas más altamente dispersos: E. E. OSTWALD ha logrado que el agua destilada ópticamente vacía, pues los rayos visibles que son los de mayor longitud de onda pasaban sin desviación apreciable, diese una figura muy clara del fenómeno de TYNDALL en la placa fotográfica, la cual, como sabemos, aprecia los rayos ultravioletas invisibles para nosotros y desviados por los obstáculos más finos. Con la fotografía se podrán apreciar, por lo tanto, finos enturbiamientos no apreciables a simple vista. En el ejemplo citado del agua destilada las impurezas consistían en polvillo del aire casi imposibles de evitar.

Se ha discutido mucho sobre si los sistemas moleculares dispersos presentarían necesariamente enturbiamientos apreciables por este método y atribuibles efectivamente a la acción de las moléculas sobre los rayos ultravioletas. En algunos casos, como para soluciones de azúcar, ha sido imposible, a pesar de todos los cuidados, obtenerlas ópticamente vacías; en cambio, otros sistemas moleculares dispersos

tras escrupulosa limpieza por métodos especiales no presentaban en absoluto el fenómeno de TYNDALL. La opinión de W. OSTWALD, de quien como hemos dicho tomamos estas ideas, es que también los sistemas moleculares dispersos perfectamente limpios y en suficiente grosor presentan heterogeneidad óptica apreciable por desviaciones de los rayos ultravioletas originada precisamente por las moléculas.

Siguiendo más lejos en este orden de ideas, tuvo el físico alemán LAUE la idea genial de pensar que rayos de menor longitud de onda, como son los rayos X, cuyo valor es aproximadamente 0,04-0,06 $\mu\mu$, podrían delatar por el mismo procedimiento obstáculos mucho más finos, y lo aplicó al estudio de la estructura de los cristales iniciando un método cuyos trascendentales resultados se pueden ya apreciar en cristalografía, pues se obtienen imágenes llamadas de LAUE en las que aparecen pequeñas manchas por cuya disposición se puede deducir la de los átomos, según la vieja teoría reticular de HAUY.

Serie óptica según el grado de dispersión

Quedaría establecido, según lo dicho, así: Enturbiamiento microscópico en los sistemas de dispersión grosera, fenómeno de TYNDALL

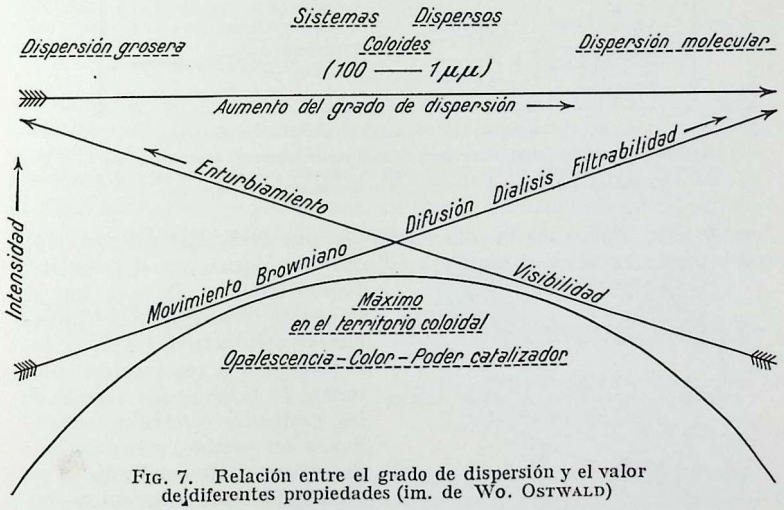


FIG. 7. Relación entre el grado de dispersión y el valor de diferentes propiedades (im. de Wo. OSTWALD)

en los coloides típicos, el mismo fenómeno delatado por la placa fotográfica producido en los sistemas moleculares dispersos por la desviación de las radiaciones ultravioletas, y por fin, fenómeno de TYNDALL de los rayos X denunciador con gran probabilidad de la disposición de los átomos en los llamados sistemas homogéneos.

Con esto, y dejando la interesante cuestión del color en la serie dispersa, es decir, de la relación entre color y grado de dispersión, por no tener tanto interés práctico en la biología, pasaremos al estudio del fenómeno de TYNDALL mediante el microscopio. Unicamente diremos que las mayores intensidades del color aparecen para muchas substancias en el *territorio coloidal* de los sistemas dispersos; esta cualidad, como la opalescencia, como la acción catalítica vendría dada por una curva de esta forma (fig. 7) en que las abscisas representan el grado de dispersión que aumenta en el sentido de la flecha, y las ordenadas, las intensidades de las cualidades antes indicadas, las cuales como se ve aumentan al pasar de los estados de menor dispersión al territorio coloidal, allí adquieren su máximo, y decrecen otra vez al llegar a la dispersión máxima o molecular.

El fenómeno de Tyndall visto al microscopio

Ya el belga W. SPRING utilizaba una lente para estudiar el cono de TYNDALL, luego ZSIGMONDY tuvo la idea de observar la parte más

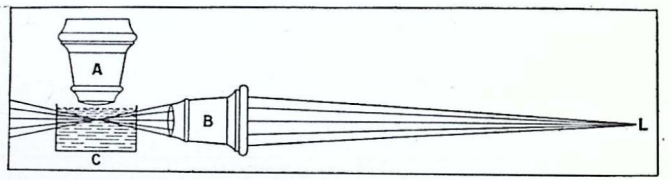


FIG. 8. Fenómeno de TYNDALL, visto al microscopio
Mediante el microscopio *B* se proyecta el cono luminoso procedente de *L* a través de la cubeta *C*, en donde está la solución coloidal que se observa iluminada así y sobre fondo oscuro mediante el microscopio *A*

fina de este cono o sea la más iluminada por medio del microscopio, como puede verse en el esquema adjunto que representa el primitivo dispositivo (fig. 8), que fué el origen de la invención del **Ultramicroscopio** actual. Como se ve, el problema a resolver era solamente *la iluminación lateral de las partículas coloidales*, colocadas, a ser posible, sobre un fondo oscuro. Este resultado se ha conseguido por diferentes medios. Así, COTTON y MOUTON imaginaron (fig. 9) el colocar la preparación a observar y con intermedio de una gota de aceite de cedro sobre un bloque de vidrio tallado en forma de paralelepípedo oblicuo, de base rectangular, de espesor y ángulo perfectamente calculados

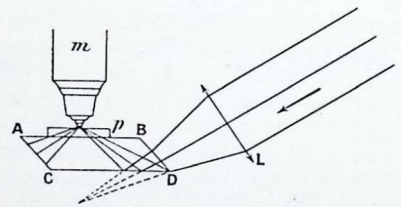


FIG. 9. Dispositivo de COTTON y MOUTON
L, lente; *ABCD*, bloque de vidrio; *p*, preparación; *m*, microscopio

para que los rayos luminosos oblicuos y condensados por una lente incidan sobre la cara lateral y oblicua del paralelepípedo, sufran en su base la reflexión total, iluminen oblicuamente la preparación, sufran otra vez la reflexión total y salgan del campo microscópico, en cuyo sistema óptico sólo penetran los rayos de luz difractados

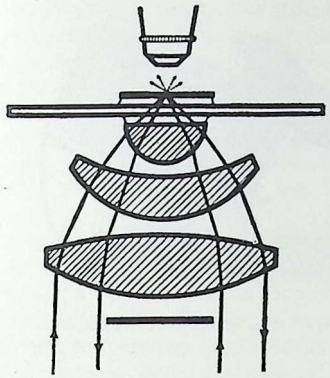


FIG. 10. Condensador paraboloide para observación de organismos sobre fondo oscuro (según H. SIEDENTOPF)

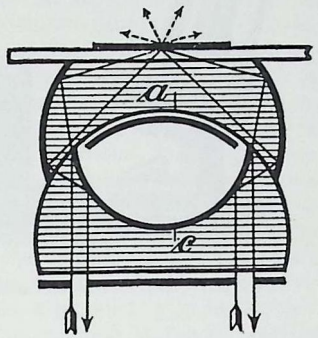


FIG. 11. Condensador cardioide

en las partículas dispersas de la preparación. SIEDENTOPF ideó, para conseguir este fin, sustituir el condensador ordinario de ABBÉ, por el llamado **condensador parabólico** (fig. 10) cuya marcha de los rayos se ve claramente en la figura adjunta, se consigue al mismo tiempo en él, la observación sobre fondo oscuro, mediante un diafragma de abertura circular, cuya parte central está ennegrecida. Hay modelos muy dife-

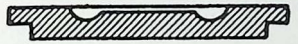


FIG. 12. Porta y cubre-objetos de cuarzo (cámara de cuarzo)

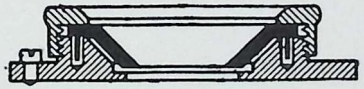


FIG. 13. Soporte para la cámara de cuarzo para el ultramicroscopio con condensador cardioide

rentes, tratándose a veces de un bloque de vidrio plano convexo cuya superficie lateral es un paraboloide de revolución, pero modernamente se ha sustituído por un sencillo espejo que tiene esta misma forma. Es éste uno de los modelos más preferidos hoy en observaciones biológicas. Otro tipo de condensador construído por la casa Zeiss es el denominado **condensador cardioide** (fig. 11), cuya marcha de rayos puede verse en la figura adjunta. Los detalles para su manejo, así como el de los portas y cubres construídos para este objeto (figu-

ras 12 y 13), lo mismo que los referentes a los focos y dispositivos luminosos más adecuados para todas estas observaciones (fig. 14),

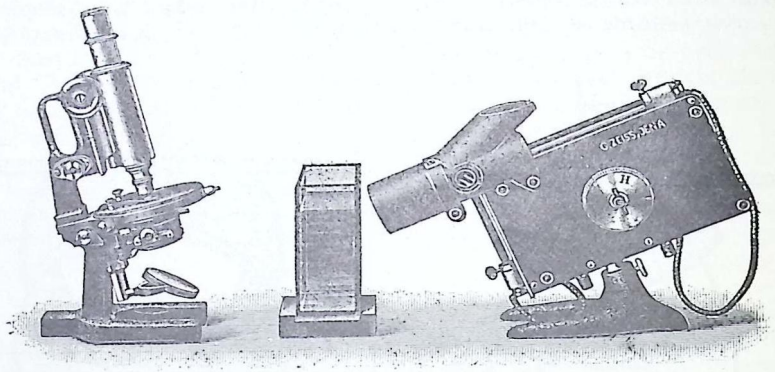


Fig. 14. Iluminación del ultramicroscopio con condensador cardioide

se saldrían por completo del fin de esta obra, son además muy encillos y se hallan siempre indicados en las notas de las casas constructoras y en las obras especiales (1).

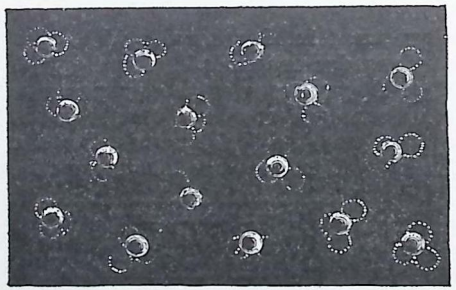


Fig. 15. Movimiento browniano (según O. Lehmann)

Por cualquiera de los métodos citados se logran ver las micelas coloidales, debiendo advertir que como es lógico se aprecian más difícilmente los coloides hidrófilos que son, en general, los que más interesan al biólogo o al médico.

Si examinamos por este procedimiento una solución coloidal, que para simplificar la escogeremos de un coloide metálico, preparado como se indica en el capítulo I, veríamos numerosísimas partículas brillantes, animadas, sin reposo, de un movimiento completamente desordenado dirigido en todas direcciones, y de velocidad diferente según el tamaño de las partículas, la temperatura, la viscosidad del líquido, etcétera, movimiento que ha recibido el nombre de browniano (fig. 15).

(1) A. Cotton, H. Mouton, *Les ultramicroscopes et les objets ultramicroscopiques*. París, 1906. Sobre todo para el que desea trabajar con el ultramicroscopio es recomendable el impreso de Carl Zeiss, Jena: *Ultramikroskopie und Dunkelfeldbeleuchtung*, cuad. 3. *Mikro* 229 publicado por la casa citada.

Movimiento browniano

Su nombre procede de su descubridor el botánico inglés R. Brown que lo descubrió en 1827. Como es natural llamó extraordinariamente la atención desde el principio y se trabajó mucho sobre él teórica y prácticamente, no habiéndose aclarado su causa hasta hace relativamente poco tiempo. Los primeros estudios tendían a dilucidar este problema que como se comprenderá es de capital importancia. El movimiento de las particulillas ¿es movimiento propio, por decirlo así, o es ocasionado por causas exteriores, variaciones de calor, sacudidas exteriores, etc.? Con los más exquisitos métodos y cuidados se realizaron experiencias que permitieron ir excluyendo poco a poco como causa del citado movimiento, las sacudidas, las variaciones de calor, la influencia de la luz, la tensión superficial, las cargas eléctricas de las diferentes partículas y en una palabra, cualquier causa externa posible. Se observó al mismo tiempo que el movimiento de las partículas coloidales era mucho más vivo que el de las correspondientes a sistemas de menor dispersión observables ya al microscopio, como lo hizo R. Brown, y se estableció ya que la viveza del movimiento aumentaba con el aumento de la dispersión, y si llegamos a la dispersión molecular nos encontramos con que la teoría cinética de los gases descansa en la aceptación de un movimiento rapidísimo tumultuoso de las moléculas en todas direcciones, lo mismo que se admite para las de los líquidos. No siendo, pues, la causa del movimiento browniano externa, habría que buscarla en alguna causa interna existente en el seno del líquido o gas y de aquí procedió el atribuirlo *al choque con las partículas coloidales de las moléculas del medio dispersante*. Es decir, se trata de un movimiento secundario transmitido a ellas del denominado movimiento molecular. Por esto los nombres de movimiento propio o molecular con que también se designa a veces el browniano son ciertamente impropias.

Es curioso advertir que tomando como base consideraciones deducidas de la teoría cinética molecular, dos físicos teóricos el conocido Alberto Einstein, en 1905, y el polaco M. Smoluchowski, en 1906, desarrollaron una teoría del movimiento browniano que les condujo a dos **fórmulas que se puede decir son las fundamentales de la cinética de los sistemas dispersos.** La de Einstein es

$$\Delta = \sqrt{K \frac{R \cdot T}{N} \cdot \frac{t}{n v}}$$

en la que Δ es la longitud del recorrido medio de las partículas, K una constante, R la constante llamada de los gases, T la temperatura absoluta, N el número de partículas de una molécula gramo de la fase dispersante (la denominada constante de Avogadro), t la duración de la oscilación, n el frotamiento interior del medio dispersante y v, el radio de las partículas supuestas esféricas. Smoluchowski siguiendo otro camino llegó a la misma fórmula, pero con la variación

de colocar delante de la raíz del segundo miembro el número 64/27 = 2,37 como factor. T. SWEDBERG y PERRIN han hecho trabajos experimentales que confirman estas deducciones teóricas. El mismo físico francés PERRIN ha comprobado experimentalmente que la ley conocida, según el nombre de su enunciador con el de *ley de Stokes* (1850) que regula la dependencia de la velocidad de pequeñas esferillas sometidas a la gravedad y a otras fuerzas en relación con factores diferentes, como viscosidad del líquido, radio de las esferillas, etc., es aplicable a partículas cuyo radio es 0,14 hasta 0,45 μ.

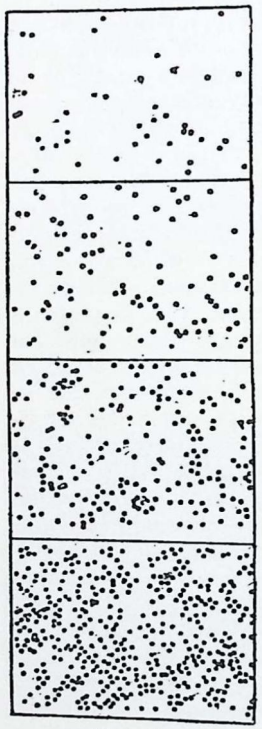


FIG. 16
Repartición de las partículas de una suspensión de goma-guta bajo la influencia de la gravedad
(0,6 μ de diámetro, 4 niveles tomados de 10 en 10 μ) (según J. PERRIN)

Experiencias de Perrin

También PERRIN *se propuso investigar si la gravedad influía en las partículas coloidales* produciendo una repartición desigual de ellas en diferentes alturas de un cilindro, como influye en la repartición de las moléculas gaseosas de nuestra atmósfera, cuya repartición varía como se sabe con la altura en las dimensiones, inmensas medidas en kilómetros admitidas para ella. Y observó, en efecto (fig. 16), trabajando con métodos especiales, que en el espesor de 0,1 milímetro las partículas de un dispersoide de MASTIC ofrecían mayor concentración en las capas inferiores y que se enrarecían a medida que dentro del pequeño espacio de 0,1 milímetro las contaba a diferentes alturas, utilizando para medir éstas el tornillo micrométrico del microscopio, es decir, que la misma ley que ordena estas ínfimas partículas, regula la repartición de las moléculas gaseosas en el espesor kilométrico de nuestra atmósfera y se aplica a esferas de tamaño creciente, como son las que constituyen nuestro sistema planetario, alcanzando, por fin, a todos los mundos estelares del Universo. Como dice en el prólogo de su famoso libro titulado *L'atome*, sentimos al pensar en esto la impresión que produce la frase de Pascal cuando dice que «el hombre se mueve entre dos infinitos» grande y pequeño.

Aplicaciones de estos hechos a la Biología y Medicina

Se ha aplicado, como es lógico, el ultramicroscopio a la observación en vivo del protoplasma, y aunque la luz demasiado intensa que aquel instrumento requiere lo mata pronto, se ve que existen muchísimas partículas de diferente tamaño, algunas coloidales, animadas de vivos movimientos. Esta observación puede conducir a la errónea concepción de que la vida comienza ya en el tamaño ultramicroscópico, es decir, que su unidad es inferior a la célula, pero tales movimientos en muchos casos no son sino brownianos, que en nada pueden explicar la gran complicación resultante de tantos factores que ordenados coadyuvan a originar la vida.

Mediante el movimiento browniano y especialmente aplicando el hecho de su avivación por la elevación de temperatura se han explicado algunos fenómenos de gran interés vital, como lo son en las reacciones intervenidas por fermentos, su avivación por el aumento de calor, aunque es claro que en este fenómeno intervienen también otra porción de causas muy complejas.

Es sabido que el ultramicroscopio se ha empleado para el estudio de ciertas bacterias y que desde que el bacteriólogo francés D'HERELLE descubrió el fenómeno de su nombre relativo a la probable existencia de verdaderos parásitos ultramicroscópicos, de los microbios ocasionantes de las enfermedades infecciosas, el estudio de estos seres y en general de los gérmenes llamados ultrafiltrantes ha abierto nuevos horizontes a la Bacteriología que se beneficiará indudablemente de este medio de investigación.

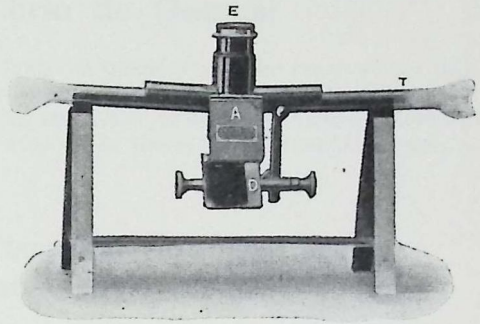


FIG. 17. Aglutinoscopio de KUHN-WOITHE
A, cámara oscura en la que se introducen los dos tubos *T* que contienen los líquidos a examinar; *D*, espejo para su iluminación lateral; *E*, ocular

El método citado de LAUE de utilización de los rayos X para el estudio de cristales, se emplea ya en el estudio de coloides, habiendo llegado especialmente SCHERRER y DEBYE con procedimientos especiales a demostrar que algunas partículas coloidales tienen estructura cristalina, al paso que otras dan al ser atravesadas por los rayos X, figuras correspondientes a la estructura amorfa. También en Histología se emplea ya ese método para aclarar la estructura de ciertas fibrillas, etc., y para descubrir la fina constitución de substancias hasta hoy consideradas como homogéneas.

Por último, la utilización del fenómeno de TYNDALL para la apreciación de finos enturbiamientos que se producen en ciertas reacciones llamadas de inmunidad (fig. 17), es ya de uso corriente, y son ya indispensables en los laboratorios distintos dispositivos adecuados a tal fin y que se conocen con el nombre general de *nefelómetros*.

Pero donde se hace indispensable el ultramicroscopio es en el estudio en vivo, como hemos dicho, de las finas estructuras celulares, y de los seres microscópicos. La constitución del protoplasma, la existencia o no de tantos detalles morfológicos como se han descrito utilizando los métodos de la técnica micrográfica, aplicados a objetos conservados sin vida, la influencia de agentes diferentes modificadores de la tensión superficial y de otros fenómenos que afectan tanto al estado coloidal y, por lo tanto, que influyen de tal modo en la estructura celular, y como consecuencia de los fenómenos íntimos vitales, son constantemente el objeto de la investigación mediante el ultramicroscopio, habiéndose obtenido ya resultados interesantes de que hablaremos en los capítulos siguientes.

Capítulo III

Disociación electrolítica. — Ósmosis. Equilibrio de Donnan

Teniendo que hablar, tanto en química coloidal como en los procesos de la química clásica, de *iones* y especialmente al tratar de la cuestión de la *ósmosis* y del *equilibrio de Donnan*, parece oportuno recordar aquí los fundamentos de la teoría de la *disociación electrolítica* (1).

I. Historia y fundamentos de la electroquímica y de la teoría de la disociación

Los comienzos de esta teoría se hallan ya muy alejados. Nicholson y Carlysle (1800) encontraron, y Davy en 1808 lo atestiguó, que los líquidos conductores de electricidad no permanecen invariables como los metales cuando son atravesados por una corriente eléctrica, sino que son descompuestos, es decir, que la afinidad química que causó la unión de los elementos para formar las sales que en aquellos líquidos estaban disueltas, queda anulada con el paso de la corriente eléctrica ; las sales, en una palabra, se descomponen.

El hecho de que los productos de la descomposición sean atraídos por los electrodos, donde se depositan o desprenden, demuestra que poseían antes de la separación una carga eléctrica, pues sino, no se puede entender la atracción. Tendrán que ser materiales de carga positiva los que se acumulen en el electrodo negativo y viceversa.

Faraday rogó al filósofo Wheweli que formase las palabras adecuadas para los integrantes del fenómeno. Y desde entonces llamó y se conservan los nombres de *cátodo* al polo negativo, es decir, al polo hacia el que caminan los *cationes* o sea la parte metálica o posi-

(1) El lector podrá, seguramente, entender las cuestiones referentes a la ósmosis y al caso especial de ésta, denominada Equilibrio de Donnan, que son las que interesan al biólogo, sin detenerse en leer la Teoría de la Disociación, pero por si le fuese conveniente recordar sus fundamentos daremos aquí un breve resumen de ellos.

tiva de los *electrólitos* (1), y *ánodo* al electrodo hacia el que caminan los aniones.

Todo el fenómeno se denomina **electrólisis.** Estas palabras proceden del griego y significan: ion = caminante; anión = caminar a favor; y catión = caminar en contra. Ambos sentidos entendidos respecto a la corriente eléctrica. Hacia el año 1833 descubrió FARADAY la ley que lleva su nombre y que en esencia dice que « mismas cantidades de electricidad descomponen idénticas cantidades de electrólitos sea cualquiera la naturaleza de éstos. Sólo hay que tener en cuenta que las cantidades de los cuerpos no se miden tomando como unidad el gramo, sino el individuo químico, es decir, el peso atómico expresado en gramos para los univalentes, dividido por dos para los bivalentes, etc. Esta ley es válida no sólo para las soluciones acuosas, sino para las demás, para sales fundidas y para todas las temperaturas.

Desde el principio chocó el hecho de que los productos de la descomposición electrolítica, por ejemplo, el H_2 y el O_2 originados al descomponerse el agua acidulada con SO_4H_2 apareciesen en sitios tan alejados como si ambos procediesen de diferentes moléculas y no de una misma. Llegaron a pensar en las posibilidades más extrañas, como son las de suponer que ambos elementos no procedían del agua o que la electricidad misma fuese un ácido.

GROTTHUSS, en 1808, propuso como explicación: que el anión que se desprendía en el ánodo procedía de la molécula que estaba inmediata a él, lo mismo que el catión que se desprende en el cátodo de la molécula más cercana a éste. Lo que de ambos quedaba iba a buscar la parte perdida en la molécula inmediata, y así sucesivamente hasta que la mitad de las dos se encontrasen a medio camino entre el cátodo y el ánodo, y se reuniesen. Parece ser que FARADAY aceptó esta explicación que aparece aún hoy en muchos libros.

GROVE, en 1845, que hacía experiencias con el elemento galvánico de su nombre, cuyos electrodos son precisamente de H y de O, y cuya energía tiene su origen en la unión de ambos para formar H_2O, apuntó la idea de que para que se desprendiesen ambos elementos con la corriente, no era necesario que se desprendiese una molécula de agua, *sino que debían estar ya allí los dos separados de antemano.*

CLAUSIUS, en 1857, recogió este pensamiento que parece ser el albor de la teoría de la disociación actual, decía: Si fuese verdad que las moléculas se desgarran en la electrólisis, haría falta cierta fuerza para ello y no se explicaría que diferencias de tensiones entre los dos electrodos a veces pequeñísimas, pudiesen provocar la ruptura de aquellas cuya energía de formación es considerable como sucede en

(1) El agua pura, como se sabe, es mala conductora de la electricidad, pero hay ciertas substancias como el ClNa y en general las sales, que al disolverse en ella la hacen buena conductora; estas substancias se denominan *electrólitos.* En cambio, el azúcar y las demás substancias que no poseen este poder de las sales no serán electrólitos.

el caso de la descomposición del NO_3Ag entre electrodos de Ag. La electrólisis de esta sal se verifica, como es sabido, con diferencias de potencial extremadamente pequeñas, es decir, con un gasto de trabajo minimal en relación con el que se necesita para formarla. Indicó que no se podía, por lo tanto, aceptar la idea de que « las partes de la molécula de un electrólito, estuvieren unidas sólidamente entre sí y con una disposición perfectamente regular ».

Antes, ya WILLIAMSON (1851) creía que, por ejemplo, en ClH « cada átomo de H no puede estar reposadamente junto a otro de Cl, con el que primeramente se unió, sino que tiene lugar un cambio constante con otros átomos de H. Si esto es cierto, añadía, durante cierto tiempo deben estar *ambos radicales libres en el líquido,* cuyo tiempo será tanto mayor cuanto más diluída sea la disolución, es decir, cuando las moléculas estén más separadas entre sí. CLAUSIUS aceptó tal hipótesis, pero por falta de medios de experimentación no pudieron hacerse idea de la relación que existiría en un momento dado entre las moléculas cuyos átomos estaban unidos, y las que están descompuestas, o como hoy se dice, disociadas.

En esto aparecieron los importantes trabajos de HITTORF, el cual observó que en la electrólisis aparecen variaciones de concentración en el ánodo y en el cátodo y dedujo que tales variaciones no podían ser explicadas más que por una *diferencia en la velocidad de traslación de las partículas* (que son las conductoras de esta carga eléctrica) es decir, por una diferencia en el rozamiento entre ellas y el agua.

KOHLRAUSCH con esta base y con la de sus experiencias enunció la *ley de la independencia de emigración de los iones.* Es decir, que en disoluciones diluídas la conductibilidad eléctrica se podía calcular sumando los valores de la movilidad de ambos iones, y que un ión el K, por ejemplo, conduce la corriente igualmente, si estuviese en disolución en compañía del ión Cl ó del No_3, es decir, si la disolución encerrase ClK ó No_3K, etc. Por lo tanto, para conocer la conductibilidad de una sal basta conocer la velocidad de emigración de ambos iones, la cual es siempre la misma sea cualquiera la sal, y sumarlas.

De esto parece deducirse que los *iones existen separadamente en las disoluciones e independientemente de la naturaleza de los otros.*

Entonces VAN'T HOFF aplicó las leyes de los gases a las soluciones y apoyándose en los datos dados a conocer por PFEFFER en sus experimentos sobre la presión osmótica del azúcar de caña, dedujo la ley que hoy es fundamento de la teoría de las soluciones, a saber: « La presión osmótica de una disolución, corresponde a la presión que ejercería la misma substancia disuelta, al estado de gas o de vapor en el mismo volumen y a la misma temperatura ». O sea, llamando p a la presión osmótica, y v a su volumen en el que se disuelve *una* molécula gramo (entendiendo por molécula gramo el valor en gramos del peso molecular del cuerpo; así, si el peso molecular del azúcar

de caña es 342, 342 gramos de azúcar de caña será el valor de una molécula-gramo), se tendrá :

$$p \cdot v = R \cdot T$$

siendo T la temperatura absoluta (273 + los grados centígrados y R lo que se llama la constante de los gases = 0,0821) (1). Tal ley es válida en el caso de líquidos *no* conductores de electricidad o sea no electrólitos, como las soluciones de sacarosa, pues para los conductores observó que había que añadir a aquella fórmula un factor que lo llamó i; entonces se tiene $p \cdot v = i \cdot R \cdot T$. Siendo i un número variable para cada sal y sólo cognoscible por la experiencia.

ARRHENIUS aprovechó estos datos y los de PFEFFER sobre presión osmótica de las disoluciones, y tomando como bases las medidas tan precisas que KOLHRAUSCH había encontrado sobre conductibilidad eléctrica de las disoluciones se propuso *calcular el número de moléculas que participaban en la conducción de la corriente*, y vió que no eran todas y que precisamente la parte alícuota de ellas que participaba en la conductibilidad era *precisamente igual al valor del factor i de la segunda fórmula de Van't Hoff*. Este valor de i significa que si es para una sal = 1,7, sólo el 70 % de las moléculas disueltas participan en la conducción de la corriente (1,7 — 1 = 0,70).

Por otra parte, RAOULT, en 1878, había encontrado que las disoluciones acuosas *equimoleculares* se hielan a la *misma* temperatura, pero que las de las sales se distinguen por un descenso de la temperatura de congelación superior al que por la ley anterior les corresponde. Esto, lo mismo que la necesidad de introducir el factor i en la fórmula de VAN'T HOFF acusando una presión osmótica de las sales superior a las que les correspondía por el número de moléculas, indicaban la existencia de *más partículas* en las soluciones de sales, *que moléculas* habíamos disuelto.

Entonces ARRHENIUS se dijo, si nosotros con CLAUSIUS, GROVE y WILLIAMSON debemos aceptar la idea de la existencia de iones libres en las disoluciones, el número de éstos no debe ser tan pequeño como tales autores creen, sino que debe haber *la cantidad de ellos que corresponde al aumento de partículas* delatado por las desviaciones de las leyes de VAN'T HOFF y de RAOULT. Y como él había visto que no toda la sal que estaba en solución conducía a la corriente eléctrica, sino precisamente aquel *exceso*, por decirlo así, de moléculas que existían $i - 1$ según VAN'T HOFF, dedujo ARRHENIUS la conclusión, base de su teoría, a saber : *Los electrólitos en disolución se hallan disociados en iones en un tanto por ciento dependiente de su naturaleza y de su concentración. Dichos iones están cargados eléctricamente y son los que conducen la electricidad que pasa a través de la solución al ponerla en el circuito de una corriente.* La sacarosa y en general los no electrólitos

(1) Este número y el de la temperatura absoluta lo volveremos a encontrar y lo explicaremos al comparar las leyes de los gases con las de la ósmosis en este mismo capítulo.

no se hallan disociados en iones en las disoluciones y, por lo tanto, sus soluciones ni delatan la existencia de más partículas que moléculas disueltas ni conducen la corriente. Si ponemos en contacto ClNa en agua se disuelve en parte, pero al mismo tiempo tiene lugar una reacción en esta forma

$$NaCl \rightleftarrows Na' + Cl' \quad (1)$$

Esta es la expresión de una reacción química sencilla y debe, por fin, llegar al equilibrio y, en efecto, esto no se alcanza hasta que el 67 % de ella se haya disociado. Este 67 % se llama *grado de disociación*, obedece a la ley de las masas que rige las reacciones de la química corriente, deducida como se sabe, por experiencia y que trasladaríamos a nuestro caso así : llamemos Ci la concentración de los iones y Cm la de las moléculas no disociadas, la ley dice que

$$K = \frac{C_i^n}{Cm}$$

n, es el número de iones que procede de una sola molécula (en el caso de ClNa sería $n = 2$), para otras sales es 3, etc., y K es la constante de disociación de la sal (2).

Por experiencia se ha visto también que la disociación de las sales tiene lugar según los siguientes esquemas :

$$AgNO_3 \rightleftarrows Ag^{\cdot} + NO_3'$$
$$Na_2SO_4 \rightleftarrows Na^{\cdot} + Na^{\cdot} + SO_4''$$
$$BaCl_2 \rightleftarrows Ba^{\cdot} + Cl' + Cl'$$

También puede haber disociación por pasos como

$$BaCl_2 \rightleftarrows BaCl^{\cdot} + Cl'$$

En muchos casos no se puede, a priori, saber cómo se va a disociar una sal. Por ejemplo, para el SO_4HK se puede pensar los esquemas siguientes :

$$KHSO_4 \rightleftarrows K^{\cdot} + H^{\cdot} + SO_4''$$

ó

$$KHSO_4 \rightleftarrows K^{\cdot} + HSO_4'$$

Del modo cómo se verifica la disociación en cada caso difícil nos podemos hacer idea recurriendo a la electrólisis: en un tubo en U colocaríamos en la rama horizontal la sal a investigar, sea $KAg(CN)_2$, la disolveríamos en agua y haríamos pasar la corriente eléctrica; el catión irá a la rama del tubo en que está el cátodo y el anión a la rama

(1) Al principio los iones se designaban así Na y Cl, pero los signos + y — para indicar la carga eléctrica de los iones se sustituyeron por comodidad de impresión por · los + y por ' los —. Dos ·· o dos '' indicaron que la carga eléctrica del ión es dos, etc.

(2) En las agendas para químicos encontrará el lector, los datos hasta hoy conocidos respecto al grado de disociación de algunos ácidos, bases y sales para determinadas concentraciones y temperaturas.

del que lleva el ánodo; analizaríamos el contenido de ambas ramas verticales y veríamos que en el cátodo no hay plata y sí en el ánodo; irá aquélla, pues, unida al grupo aniónico CN'. La disociación de la sal al disolverse en el agua será

$$KAg(Cn)_2 \rightleftarrows K' + Ag(CN)_2'$$

Es claro que puede existir una disociación más completa

$$Ag(Cn)_2' \rightleftarrows Ag' + CN' + CN'$$

Pero como quiera que se ha visto que la disociación, tal como la indicamos en la primera igualdad, es casi completa y que la segunda es muy pequeña, resulta que en la disolución debe haber muchos iones $K\cdot$, muchos $Ag(CN)_2$ y despreciable cantidad de $Ag\cdot$ y CN'. Por esto aunque se prolongue mucho la electrólisis no se encuentra $Ag\cdot$ en el cátodo.

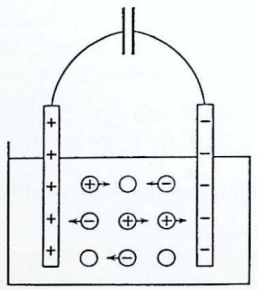


Fig. 18
Esquema de Nernst para explicar la electrólisis

Para otras sales se ha visto que rigen los siguientes esquemas :

$$KHSO_4 \rightleftarrows K\cdot + HSO_4'$$
$$AlCl_3 \rightleftarrows Al''' + Cl' + Cl' + Cl'$$
$$KMnO_4 \rightleftarrows K' + MnO_4'$$
$$K_3Fe(CN)_6 \rightleftarrows K' + K\cdot + K\cdot + Fe(CN)'''$$

o sea

$$K_3Fe(CN)_6 \rightleftarrows 3\,K\cdot + Fe''' + 6\,CN'$$

En este último caso, que es el tipo de disociación del ferrocianuro potásico en gran dilución, aparecen 10 iones, que obran, por lo tanto, para el punto de congelación, presión osmótica, etc., diez veces más enérgicamente que moléculas sencillas.

Nernst ha dado el adjunto esquema (fig. 18) para darse cuenta de la marcha de los iones y de la quietud de las moléculas no disociadas.

II. Presión osmótica, trabajo osmótico

Ya hemos dicho que van't Hoff encontró que las leyes de los gases son aplicables a la disoluciones diluídas. Se sabe que los gases tienden a ocupar cualquier espacio por grande que sea, siempre que el medio no presente obstáculos para su difusión, tal medio sería el vacío o un espacio ocupado por otro gas. Pero si oponemos un obstáculo a esta difusión ilimitada de los gases, como un tabique impermeable al gas, entonces sus moléculas chocarán contra éste y el resultado es una presión.

Los mismo que los gases son todas las substancias, sólo que hay que buscar el medio apropiado para que se difundan. Para el azúcar de caña, por ejemplo, este medio es el agua, aquél tiende a llenar ésta por completo, *se disuelve en ella.* Si añadimos agua a esta disolución, el azúcar tiende a difundirse allí caminando hacia arriba en contra de la gravedad hasta que se forme la misma concentración de azúcar en todas partes. Si separamos la disolución ya existente, del agua que añadimos, por un tabique permeable para ésta, pero no para la molécula de azúcar, el fenómeno se invierte, no pudiendo difundirse el azúcar, tiende a expansionarse aumentando el medio, es decir, *atrae el agua hacia sí a través del tabique.* Si el frasco donde está encerrada la disolución del azúcar fuese cerrado, pronto aparecería un equilibrio, pues la presión hidrostática interna equilibraría la tendencia a más entrada de agua. Esta tendencia a la expansión del azúcar se traduce, como se ve, en una presión llamada *presión osmótica.* Si el frasco que contiene el azúcar fuese abierto e impedimos por un artificio cualquiera que se forme allí la presión hidrostática interna citada, entonces atraería, efectivamente, grandes cantidades de agua.



Fig. 19. Turgescencia y plasmólisis
m, membrana celular; *p*, capa externa o membrana protoplasmática; *n*, núcleo
(Las células de las plantas ordinarias, que encierran en sus jugos glucosa, sal, sales orgánicas de Ca, de K, etc., poseen presiones de 4-5 atmósferas. Las células que encierran substancias de reserva alcanzan presiones hasta de 15-20 atmósferas; aun mayor es la de ciertas plantas jóvenes. Las bacterias poseen, en general, muy grandes presiones osmóticas; por eso se explica, según Nernst, su gran influencia fisiológica)

Lo que necesitamos para probar experimentalmente todo esto es un material que sea permeable al agua e impermeable para el azúcar, es lo que se llama un material o tabique *semipermeable;* pero conviene hacer un poco de historia en dos palabras.

Comenzaron a hacer los fisiólogos experiencias con células de plantas (fig. 19) que las colocaban en disoluciones de diferente concentración y observaron que cuando ésta era grande, su protoplasma se retraía dentro de la membrana (plasmolisis) y expulsaba agua al exterior (3), si la disolución externa era muy diluída la célula absorbía agua y el protoplasma adquiría gran *turgescencia* pegándose a la membrana (1) con ciertas concentraciones no había variación (2). Entonces decían que la solución externa y la protoplasmática eran *isotónicas* o *isosmóticas,* y se vió que eran *isotónicas las soluciones que tienen el mismo número de moléculas.* Soluciones normales, por ejemplo, de NO_3K, NO_3Na y ClK, etc., son isotónicas entre sí. Y al hacer estas experiencias notaron que las sales antes citadas tenían un poder osmótico doble que las soluciones orgánicas, azúcar, urea, etc., a igual número de moléculas, se entiende, y en disoluciones diluídas. Hoy sabemos que es porque aquéllas se disocian en dos iones, y éstas no, siendo el número de partículas doble la presión osmótica también lo será. Se planteó

entonces el problema de la medición en atmósferas de dicha presión, y para ello era menester construir una membrana *semipermeable*, como lo es la *capa externa protoplasmática*, para poder construir un dispositivo al que fuese posible aplicarle un manómetro. Una membrana semejante fué construída por TRAUBE y estaba constituída por ferrocianuro de cobre ; PFEFFER para darle consistencia tuvo la idea de hacerle un «esqueleto» (fig. 20). Limpiaba cuidadosamente una bujía o recipiente de barro o arcilla poroso, lo llenaba de ferrocianuro potásico, y luego lo introducía en una disolución SO_4Cu, ambas substancias se difunden en el tabique, reaccionaban allí y daban lugar a la formación de un precipitado de ferrocianuro de cobre que formaba la membrana semipermeable entre el esqueleto de barro. La presión se medía por la altura que el líquido alcanzaba en el tubo introducido en el líquido interno que no era sino la solución (fuese de azúcar, urea, una sal, etc.) objeto de la medición (sería la presión = volumen de la columna líquida multiplicado por la densidad) (fig. 21).

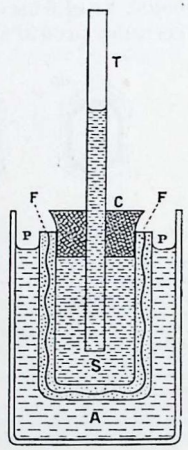


FIG. 20. Dispositivo de PFEFFER para la medida de presiones osmóticas

T, tubo de medida de la altura del líquido; *P*, recipiente de barro poroso en el seno de cuyas paredes se formaba la membrana semipermeable de ferrocianuro de cobre ; *A*, agua ; *S*, solución cuya presión osmótica deseaba medir ; *C*, tapón de corcho; *F*, membrana semipermeable de ferrocianuro de cobre

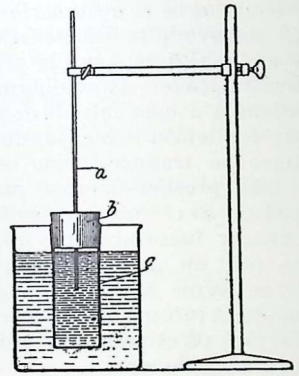


FIG. 21. Sencillo dispositivo de MICHAELIS para la demostración de la presión osmótica

a, tubo para el ascenso del líquido por efecto de la presión osmótica ; *b*, tapón de goma ; *c*, este saquito de colodión puede hacerse, como indicamos en la figura 25 para la ultrafiltración sencilla, sustituyendo el embudo por un tubo de vidrio de la anchura deseada y prescindiendo del papel filtro. Hay que pegar muy bien este saquito al tapón de goma mediante colodión también. El colodión tiene que ser muy bueno, si no no resulta la experiencia

Imitó esta experiencia realizándola con gases, RAMSAY el cual llenaba una cavidad con nitrógeno, la cerraba herméticamente mediante una tapa de paladio, y todo así dispuesto y provisto de su manómetro para poder seguir las variaciones de la presión interna, lo

introducía en una atmósfera de *hidrógeno*. Como el paladio es impermeable para el nitrógeno y permeable para el hidrógeno, éste penetraba por difusión a través del paladio como el agua en la célula vegetal y podía seguir en el manómetro el ascenso correspondiente de la presión.

Aplicación de las leyes de los gases a las disoluciones diluídas

Las primeras medidas obtenidas por PFEFFER de soluciones de azúcar a diferentes concentraciones, dieron los siguientes datos :

Concentración de sacarosa por %.	1	2	2,74	4	6
Presión total en atmósferas	0,704	1,34	1,97	2,75	4,06
Presión por gramo de azúcar....	0,704	0,67	0,72	0,69	0,68

De estos números se deduce que la presión es proporcional al tanto por ciento de concentración, es decir, inversamente proporcional al volumen en el que un gramo de azúcar está disuelto, o sea, que a *temperatura constante* podemos escribir

$$p \times v = \text{constante} \quad \text{ó} \quad p = \frac{k}{v}$$

Obsérvese que esta misma relación entre p y v se observa en los gases denominándose allí **ley de Boyle-Mariotte** o primera ley de los gases.

Quiso luego estudiar la influencia de la temperatura sobre la presión osmótica y ver si también aquí se cumplía la segunda ley de los gases o **ley de Gay-Lussac** (1) cuya fórmula se deduce así : Si elevamos la temperatura de un gas manteniendo la presión constante, encontró GAY-LUSSAC que el gas se dilata por cada grado centígrado 0,00367 de su propio volumen o sea expresado en quebrado $\frac{1}{273}$ de este volumen (2). Por lo tanto, si el volumen a 0° lo llamamos v_0 el volumen a $t°$ v_t, será

$$v_t = V_0 + \frac{1}{273} \times t \quad \text{ó} \quad v_t = v_0\ (1 + 0{,}00367 \times t)$$

Si mantenemos ahora el volumen constante y calentamos lo que se aumenta es la presión, y como según la ley de BOYLE-MARIOTTE

(1) Por ser de gran interés para la comprensión de la teoría de las disoluciones, nos vamos a permitir exponer aquí, brevemente, las leyes de GAY-LUSSAC y de AVOGADRO.

(2) Partiendo de la base de que en el 0 *absoluto* de la escala de temperatura, los gases no ejercen ninguna presión, es claro que si a cada grado se eleva aquélla en $\frac{1}{273}$ la presión será nula a — 273°, por eso se colocó allí el 0 *absoluto* y la *temperatura absoluta* T será = 273 + t, siendo t la temperatura corriente o relativa.

para cada temperatura dada existe proporcionalidad entre volumen y presión podremos escribir

$$p_t = p_0 + \frac{1}{273} t \quad \text{ó} \quad p_t = p_t\ (1 + 0{,}00367 \times t)$$

Ambas leyes de volumen y presión se pueden resumir como sigue: Como según la misma ley citada $p \times v = k$ a temperatura constante, si dejamos variar volumen y presión de cierta cantidad de gas cuya *temperatura varía* pasando de 0 a t grados, entonces tendríamos que introducir el factor temperatura t, es decir, en general $p \times v = K \times t$; llamemos a esta igualdad (a).

Pero antes hemos dicho que al calentar cierta cantidad de gas de volumen v_0, a presión constante p_0, v_t no será ya igual a k, sino a kt, es decir, que también $p_0\ v_t = p_0 v_0\ (1 + \frac{1}{273} t) = Kt$; llamémosla (b).

O sea, que $(a) = (b)$ luego $pv = p_0 v_0\ (1 + \frac{1}{273}\ t) = \frac{p_0 v_0}{273}$ $(273 + t)$; llamémosla (c).

Como sabemos que $273 + t$ es la temperatura absoluta T, tendremos, por fin, la fórmula de Gay-Lussac, así:

$$pv = \frac{p_0 v_0}{273} T.$$

Tercera ley o **ley de Avogadro** (1811), dice: « Que todos los gases bajo las mismas condiciones de presión y temperatura encierran en la unidad de volumen el mismo número de moléculas». Por lo tanto, sus masas se comportan como sus pesos moleculares, esto quiere decir que 2 gr. de hidrógeno (H_2), 32 de oxígeno (O_2), 44 gr. de (CO_2), 28 de nitrógeno (N_2) o sea, cantidades (de los más diferentes gases tomadas en gramos) iguales a sus pesos moleculares, mantenidos a 0° y bajo una presión de 760 mm. de mercurio, adquieren todos el mismo volumen que la experiencia ha demostrado ser *22,42 litros*. Sustituyendo en la fórmula de Gay-Lussac v_0 por este valor como $p = 1$ atmósfera, tendremos

$$pv = \frac{p_0 v_0}{273} T = \frac{1 \times 22{,}42}{273} T = 0{,}0821\ T.$$

Este número 0,0821 es lo que se llama *la constante de los gases* y se le suele expresar por la letra R. Así que la fórmula que nos da el valor de $p\ v$ a cualquier temperatura es en definitiva

$$pv = 0{,}0821\ T = RT$$

Comprobación de estas leyes para las disoluciones diluídas. La primera ya hemos visto que según la experiencia, se cumplía. Luego Pfeffer estudió la influencia de la temperatura sobre la presión osmótica obteniendo los resultados siguientes:

Temperaturas	Presión		Diferencias
	Observadas	Calculadas	
6,8	0,664	0,665	+ 0,001
13,7	0,691	0,681	— 0,010
14,2	0,671	0,682	+ 0,011
15,5	0,684	0,686	+ 0,002
22	0,721	0,701	— 0,020
32	0,716	0,725	+ 0,009
36	0,746	0,735	— 0,011

Para calcular las presiones teóricamente, que, como se ve, coinciden bastante bien con las dadas por los resultados experimentales, se valió de la fórmula que antes hemos indicado

$$p_t = p_0\ (1 + 0{,}00367 \times t)$$

Vamos a poner un ejemplo: Observó que una solución de azúcar de caña al 1 % y a 0° posee una presión de 0,649 atmósferas, si se cumple aquí la ley de Gay-Lussac, a $t°$ la presión será

$$p_t = 0{,}649 \times (1 + 0{,}00367\ t)$$

y si la solución en vez de ser al 1 % fuese al n % la presión osmótica sería $p_t = n \times 0{,}649 \times (1 + 0{,}00367\ t)$ atmósferas. Dedujo él por esta fórmula teóricamente, que a 13,7° una solución al 4 % de sacarosa debía tener una presión osmótica de 2,73 atmósferas; la experiencia le enseñó que era efectivamente 2,74, se puede, por lo tanto, decir que la *ley de Gay-Lussac* se cumple para las disoluciones *diluídas*.

Para ver si la ley de Avogadro también se cumplía, hizo las consideraciones siguientes: Hemos visto que una solución de sacarosa al 1 % posee una presión de 0,649 atmósferas, a 0° ¿qué volumen le asignaremos? o sea, ¿cuál es el valor de v_0?, el peso molecular de la sacarosa es 342 gr. como en una disolución de 1 % hay *un* gramo, para hacer con los 342 gr. una solución al 1 % deberemos tomar 342 veces más de agua, es decir, 342 gr. × 100 ó sea *34,2 litros*. Hizo las sustituciones consiguientes en la fórmula

$$pv = \frac{p_0 v_0}{273} T = \frac{0{,}649 \times 32{,}4}{273} T$$

haciendo las operaciones del quebrado resulta el número 0,0823 ó sea $pv = 0{,}0823\ T$, comparando con la de los gases $pv = 0{,}0821\ T$ se ve que sensiblemente coinciden (la diferencia pequeña puede achacarse a faltas de la experimentación). Por todo esto, se ve que, en efecto, *las leyes de los gases son aplicables a las disoluciones diluídas* o sea que *la presión osmótica de una substancia disuelta es la misma que ejercería si fuese gas y si el líquido desapareciese, es decir, 22,4 atmósferas por molécula y en un litro*. Repitiendo estas experiencias con

diversas sales *electrólitos* se vió que su presión osmótica era superior a la correspondiente según el número de moléculas. En la fórmula anterior tenía que introducir un factor i variable, que sólo la experiencia lo podía dar a conocer, y que al no poder ser aplicado por las ideas de entonces, indujeron a ARRHENIUS junto con las anomalías encontradas por RAOULT en la crioscopia, y con los estudios sobre conductibilidad eléctrica de las disoluciones a formular su teoría de la disociación de que antes hemos hablado.

Trabajo osmótico

Acabamos de ver que se cumplen las leyes de los gases cuando las aplicamos a las disoluciones diluídas; no es raro, por lo tanto, que así como los gases al *expansionarse* pueden producir un trabajo, puedan también las disoluciones diluídas producirlo al diluirlas más, ya que al hacer esto no hacemos otra cosa que repartir lo disuelto en un espacio mayor, es decir, dilatarlo, expansionarlo. Sea v el volumen de una disolución en la cual se encuentran n moléculas de azúcar de caña, y supongamos que la diluímos, con lo cual rebajamos la presión osmótica de p_1 a p_2, el trabajo A utilizable aplicando la fórmula para el mismo caso en los gases [1]

$$A = nRT \ln \frac{p_1}{p_2},$$

o como la concentración y la presión son iguales,

$$A = nRT \ln \frac{C_1}{C_2},$$

o como la presión osmótica es inversamente proporcional a la dilución,

$$\left(\text{volumen } v \text{ para cada mol.} = \text{dilución} = \frac{1}{\text{concentración}}\right),$$

se tendrá al fin

$$A = nRT \ln \frac{v_2}{v_1}$$

Estas tres fórmulas nos darán el trabajo en relación con la concentración, o con la dilución, o con la presión osmótica, y las utilizaremos al hablar del equilibrio osmótico de DONNAN.

(1) La derivación de esta fórmula, que nosotros no la volveremos a encontrar más que al hablar del equilibrio osmótico de DONNAN, requiere el cálculo integral, y para no desviarnos demasiado lo dejaremos. El lector podrá encontrarlo en diferentes libros, por ejemplo, *Electrochemie*, I, de HEINRICH DANNIEL, 1920 (Colección Göschen). Sabemos que R. es la constante de los gases y ln quiere decir logaritmos naturales, que para pasar a los de BRIGG con base 10 bastará multiplicarlo por 0,4343.

Explicaciones sobre lo que puede ser la presión osmótica

Siguiendo esta comparación con los gases, podemos pensar lo primero que la presión osmótica es, como en aquéllos, el resultado de los choques de las moléculas que se hallan en continuo movimiento contra las paredes de la membrana. Así: si dejamos caer con sumo cuidado, con una pipeta capilar (fig. 22), y muy lentamente, una gota de una disolución concentrada de SO_4Cu en la superficie de una disolución diluída de ferrocianuro potásico, entonces se rodeará en seguida de una membrana semipermeable de ferrocianuro de cobre que al retirar la pipeta, quedará como una bolsa llena de un líquido azul colgando de la superficie del líquido claro. La bolsa aumenta progresivamente de tamaño por la entrada en ella del agua de fuera, y se verá junto a ella formarse unas estrías que son de solución concentrada de ferrocianuro potásico formada allí al perder el agua. Entra sólo ésta, pues el líquido interno queda azul y claro y de entrar también ferrocianuro potásico reaccionaría con el SO_4Cu y precipitaría ferrocianuro de cobre. Aquí podemos interpretar tal fenómeno aceptando la teoría cinética suponiendo que los choques de las moléculas de dentro por ser su disolución más concentrada que la de fuera serán más numerosos y, por lo tanto, la presión interna aumentaría, la bolsa se dilatará y tendría que entrar allí agua para ocupar el nuevo volumen. Pero en el caso de la célula de PFEFFER, ¿qué es lo que hace subir al agua en el tubo interno? ¿cómo se puede explicar que la presión osmótica produzca tal fenómeno, aplicando la teoría cinética de los gases? Ya vimos al hablar del experimento de PFEFFER que RAMSAY lo imitó con gases. Allí la explicación era fácil, el hidrógeno tiene menos presión dentro de la célula (puesto que no hay y, por lo tanto, para él existe el vacío) que fuera, y por consiguiente, entrará hasta igualar las presiones de H interna y externa, y al entrar su presión se sumará con la del nitrógeno y se elevará, por ello, la total indicada por el manómetro. Lo que medimos entonces es, por decirlo así, la presión osmótica del nitrógeno disuelto en el hidrógeno. Se podría trasladar esta explicación al caso de PFEFFER, diciendo que el *agua* en la célula de su nombre está en menor concentración que fuera, y por lo cual habrá tendencia a igualarla y entrará, pero esto es sólo una imagen, quizá sólo un juego de palabras.

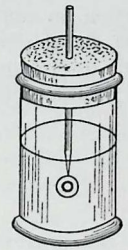


FIG. 22. Dispositivo usado por W. PFEFFER para obtener células artificiales

En el frasco se coloca una sol. del 2 % al 5 % de ferrocianuro potásico. El tubo capilar que atraviesa el tapón se llena de SO_4Cu en solución, se cierra el tubo por arriba con el dedo y poco a poco se deja salir una gota de SO_4Cu por la punta del capilar en el seno del líquido externo

Algunos invocan la teoría de que en la disolución hay una unión entre lo disuelto y el disolvente, se formaría como un hidrato. Existiría según esta teoría una fuerza de atracción entre ambos, habría,

por lo tanto, una verdadera *atracción* de lo disuelto de dentro sobre el agua de fuera.

Basándose en los experimentos de HULETT sobre la resistencia a la *tracción* de hilos de líquidos, se ha hablado de que en éstos existe una presión interior que tiende a llevar sus moléculas hacia *adentro*, es decir, que las de la superficie tienden a bajar. Como las substancias disueltas parece ser que obran en contra de tal presión interna, las moléculas de la superficie del líquido del interior de la célula tenderán a bajar *menos* que las de fuera, y esta diferencia sólo se equilibrará bajando las de fuera y subiendo las de dentro. Como se ve, existen varias explicaciones bastante diferentes para aclarar la presión osmótica, lo cual quiere claramente decir que a la hora actual no sabemos en qué consiste; lo cual no quita para que se pueda medir y para que, como se ha visto, se hayan sacado consecuencias prácticas muy interesantes de su estudio.

Equilibrio osmótico de Donnan

Diferentes casos y consecuencias

El profesor londinense DONNAN [1] descubrió que los coloides disueltos ejercen cierta influencia sobre la repartición de los electrólitos fácilmente dializables, en el líquido interno y en el externo en el fenómeno de la ósmosis. En presencia de coloides disueltos el equilibrio osmótico de las sales se establece sensiblemente diferente que en su ausencia. Sus primeras consideraciones las hizo trabajando con electrólitos coloides entre los que se cuenta el rojo de congo. En éste el anión es tan grande que no puede atravesar la membrana, mientras que el catión Na·-ión es fácilmente dializable, siempre que no sea retenido por el anión. Hay que tener en cuenta que en la solución deben existir igual número de aniones que de cationes. Si añadimos al agua destilada que constituye el líquido exterior un segundo electrólito, por ejemplo, el ClNa, éste según las ideas antiguas sobre ósmosis debía alcanzar, al cabo de un tiempo suficiente, la misma concentración en los líquidos exterior e interior, pero en los hechos se ve que esto no sucede; se ve que el electrólito coloidal ejerce una acción en el sentido de que la concentración del ClNa, una vez alcanzado el equilibrio, es mayor fuera que dentro de la membrana. Llamando (1) y (2) a los líquidos interno y externo, respectivamente, y R′ al anión coloidal que no puede atravesar la membrana, la situación esquemática de los iones a un lado y otro de esta membrana será:

Al principio			En equilibrio alcanzado	
(1)	(2)		(1)	(2)
Na·	Na·	Cl y Na difundirán del (2) al (1),	Na·	Na·
R′	Cl′	en cambio R′ no puede pasar al (2)	R′	
			Cl′	Cl′

[1] F. G. DONNAN, *Zeitschr. f. Elektrochemie*, 17, 572 a 581 (1911).

Supongamos que los electrólitos están totalmente disociados y que los líquidos interno (1) y externo (2) tienen el mismo volumen, entonces las concentraciones vendrán dadas como indica el siguiente esquema:

	Situación al principio				Situación en equilibrio				
	(1)		(2)		(1)			(2)	
Iones.....	R′	Na·	Cl′	Na·	R′	Cl′	Na·	Cl′	Na·
Sus concentraciones.....	C_1	C_1	C_2	C_2	C_1	X	C_1-X	C_2-X	C_2-X

Llamando X a la cantidad de ClNa o sea de iones Cl′ y Na· que han pasado de (2) a (1).

Se quiso desde luego hallar el valor de X, y se consiguió mediante las consideraciones siguientes. Es evidente que el paso del ión Cl′ del (2) al (1) donde no hay nada, Cl representa una expansión de este ión, cuya expansión tiene que ir acompañada como sucede en la de los gases de producción de trabajo utilizable. La fórmula de este trabajo osmótico es, como vimos al hablar de la ósmosis $= dn\,RT \ln \frac{(Cl')_2}{(Cl')_1}$ siendo $(Cl')_2$ y $(Cl')_1$ las concentraciónes del ión Cl en el líquido exterior (2) y en el interior (1), respectivamente. En cambio, el paso de Na· de (2) a (1) representa para el líquido interno un aumento de concentración de iones Na·, para cuyo aumento será necesario emplear cierto trabajo, que por ser perdido lo representaremos con el signo menos o sea $= -dn\,RT \ln \frac{(Na\cdot)_1}{(Na\cdot)_2}$.

Como es evidente que al establecerse el equilibrio no hay trabajo utilizable ni perdido, resulta que los trabajos preparados deben ser iguales a los gastados o sea

$$dn\,RT \ln \frac{(Cl')_2}{(Cl')_1} - dn\,RT \ln \frac{(Na\cdot)_1}{(Na\cdot)_2} = \text{o de donde } \frac{(Cl')_2}{(Cl')_1} = \frac{(Na\cdot)_1}{(Na\cdot)_2},$$

luego

$$(Na\cdot)_1 \times (Cl')_1 = (Na\cdot)_2 \times (Cl')_2$$

y poniendo en esta igualdad en vez de las concentraciones indicadas, sus valores dados en el esquema anterior en la situación de equilibrio se tendrá $(C_1 + x)\,x = (C_2 - x)^2$ y realizando las operaciones indicadas de x tendremos

$$x = \frac{C_2^2}{C_1 - 2\,C_2}$$

De esta fórmula se deduce que si la concentración de R′ Na· ó sea C_1 fuese grande, el valor de x sería muy pequeño, es decir, pasaría muy poco ClNa del (2) al (1). Si por el contrario, existiese poco

R'Na en (1), es decir, poco catión coloidal, C_1 tendría un valor muy pequeño y en el límite $x = \frac{C_2^2}{0 + 2C_2^2}$ ó sea que pasaría justo la unidad de ClNa del (2) al (1) y las concentraciones de ClNa en (1) y en (2) en el momento del equilibrio serían iguales. Las experiencias de Donnan y sus discípulos investigando equilibrios osmóticos en condiciones análogas a las citadas han confirmado prácticamente estas presunciones teóricas.

Influencia sobre la presión osmótica. El hecho de la desigual repartición de ClNa a los dos lados de la membrana en el momento del equilibrio, influye en la presión osmótica. Si P_0 es la presión osmótica primitiva de Na R y P_1 la observada cuando ya el equilibrio se ha establecido, se deduce, según Donnan que

$$\frac{P_1}{P_0} = \frac{C_1 + C_2}{C_1 + 2C_2}$$

Es decir, que si C_1 es muy pequeño respecto a C_2, entonces $P_1 = \frac{1}{2} P_0$, o sea que cuando hay poco R Na en (1), la presión observada en (1) al final es, en el caso límite, la $\frac{1}{2}$ de la correspondiente al coloide electrólito R si él estuviese allí solo.

Si C_2 fuese pequeño contra C_1, entonces en el límite podríamos poner $\frac{P_1}{P_2} = 1$, o sea $P_1 = P_0$. Es decir, que, en este caso, no hay apenas variación en la presión.

Si el electrólito de fuera no tuviese ningún ión común con el coloide de dentro : Si en (2) hubiese, por ejemplo, ClK en vez de ClNa, entonces consideraciones análogas a las anteriores conducen a los siguientes resultados :

	Situación al principio				Situación en equilibrio	
	(1)		(2)		(1)	(2)
Iones.....	R'	Na·	Cl'	K·	R'·Cl'·Na··K·	Cl'·Na··K·
Sus concentraciones.....	C_1	C_1	C_2	C_2	C_1 y C_1-Z X	C_2-y Z C_2-X

Si la concentración de NaR fuese grande, entonces pasa casi todo K· del (2) al (1) ; en cambio, sólo un poco de Cl' atraviesa la membrana y poco Na· pasa al (2). Si al contrario, fuese la cantidad de ClK grande en relación con NaR, entonces pasaría a través de la membrana mucho más K, Cl, y Na.

Descomposición hidrolítica de las sales por la acción de una membrana. Si en un lado (1) de la membrana se encontrase NaR y en el otro (2), agua sólo, tendería Na a pasar del (1) al (2), lo cual sólo

es posible si pasase un ión electropositivo en la misma proporción del (2) al (1) ; este ion no puede ser más que el H'; aumentaría, pues, la acidez de (1) y la basicidad del (2), como se ve en el esquema adjunto:

Situación al principio		Situación en equilibrio	
(1)	(2)	(1)	(2)
Na·	{agua pura} H·	Na·	Na·
R'	{o sea con} OH'	R'	OH'
		H	

Haciendo las mismas consideraciones que antes obtendríamos

$$\frac{(Na\cdot)_1}{(Na\cdot)_2} = \frac{(OH')_2}{(OH')_1} \qquad (b)$$

Suponiendo los mismos volúmenes de líquidos en (1) y (2), y que la disolución electrolítica de todos los electrólitos allí existentes es total, entonces las concentraciones serían :

	Al principio				Al final				
	(1)		(2) Agua pura o sea		(1)			(2)	
Iones.....	Na·	R'	H·	OH'	Na·	H·	R'	Na·	OH'
Las concentraciones.....	C_1	C_1			C_1-X	X	C_1	X	X

Sustituyendo en la anterior igualdad *b* los símbolos por sus valores tendríamos :

$$\frac{C_1 - X}{X} = \frac{X}{(OH')_1} \qquad (C)$$

Como sabemos que en (1) de la situación de equilibrio, debe verificarse que el producto de los iones H existentes, o sea *X*, por el de los iones OH, sea igual a la llamada constante de disociación del agua Kw tendremos $X(OH')_1 = Kw$, multipliquemos ahora por *X* el numerador y denominador del segundo término de la igualdad (*C*) y se tendrá

$$\frac{C_1 - X}{X} = \frac{X^2}{X(OH')_1}\ ;\ \text{luego}\ \frac{C_1 - X}{X} = \frac{X^2}{Kw},$$

de donde

$$X^3 = Kw\ (C_1 - X).$$

Si X fuese muy pequeña respecto a C_1 y la despreciamos tendríamos $X = \sqrt[3]{KwC_1}$. Como $Kw = 10^{-14}$, según Kohlbrausch, en-

tonces X tendría un valor mínimo, lo que quiere decir que la disociación electrolítica de NaR sería muy pequeña.

Se puede elevar considerablemente esta acción hidrolítica, sin más que hacer que el volumen de agua de (2) sea mucho mayor que el de la disolución del (1). Haciendo, por ejemplo, $v_2 = 100\ v_1$, y suponiendo además C_1 pequeña como 0,1, en este caso fácilmente se comprende que el paso de Na· de (1) a (2) tiene que ser relativamente a la cantidad de Na·R muy grande y, por lo tanto, la descomposición hidrolítica de esta sal debe aumentar mucho.

Si la constante de disociación del ácido formado en (1) R'H' fuese pequeña, o su solubilidad muy pequeña, es evidente que ambas circunstancias obrarían en el sentido de disminuir los iones de (1), y su consecuencia sería también un aumento en la hidrolisis. DONNAN, en el trabajo citado, da detalles de sus experiencias, que confirman numéricamente todas estas deducciones teóricas.

Ionización de un ácido que posee aniones no dializables. Si en (1) hubiese un ácido R'H· no dializable y en el (2) una cantidad equivalente de Na·OH', debe pasar ésta de (2) a (1), donde reaccionará con el ácido para formar la sal R'Na·, no dializable por no serlo R'. Si el ácido no estuviese ionizado primitivamente en (1), por encontrarse en forma de cristalitos, gelatina, etc., no ejercería presión osmótica ninguna contra el agua pura ; en cambio, aparece allí en seguida una presión en cuanto pasa NaOH del (2) al (1) y se forma la sal NaR'; esta presión nos indica la existencia de iones en (1), que no pueden proceder más que de la disociación de la sal formada, uno de cuyos iones debe ser el del ácido R'.

Potencial eléctrico [1] : DONNAN ha calculado para algunos casos, la diferencia de potencial existente en estado de equilibrio [2] lo cual tiene mucha importancia para aclarar fenómenos eléctricos producidos en los seres vivos, peces, etc., y quizá para cuestiones de sistema nervioso, etc.

Se comprende el interés de estas cuestiones en Biología, sin más que fijarse que en los líquidos orgánicos abundan enormemente estos iones gigantescos no dializables (soluciones de proteínas y otros albuminoides, etc.), que por completo son del tipo que requiere la teoría de DONNAN [3].

Los fenómenos osmóticos puros y simples, tal como se concebían antes, deben ser muy raros en los seres vivos, y por lo tanto, los cambios entre célula y medio a través de la membrana celular adquieren con estas ideas rumbos muy diferentes.

---

(1) Para más detalles sobre este potencial llamado *potencial de membrana*, véase capítulo IV, y respecto a la medida del mismo se exponen los fundamentos en el último capítulo al hablar de la medida de los iones-H.

(2) Para más detalles, véanse los trabajos de DONNAN, o la obra *Kapillarchemie*, de FREUNDLICH (págs. 770 y 771).

(3) J. LOEB explica la mayoría de los fenómenos coloidales que se verifican en las disoluciones de las proteínas, basándose en la teoría de DONNAN. En el capítulo VII volveremos sobre ello.

SORENSEN ha trabajado en estos asuntos y ha dado varias leyes que rigen el equilibrio de DONNAN para las soluciones de proteínas, basándose en las fórmulas dadas por aquél.

Aplicaciones biológicas de estos hechos

Después de lo dicho, no parece necesario encarecer la importancia de estos estudios para la Biología y la Medicina en general. Continuamente se verifican en los organismos cambios entre la célula y su medio sea éste externo como en el de los organismos unicelulares, o sea interno en el organismo de que forma parte en los pluricelulares. Al estudiar la alimentación de las plantas por la absorción a través de los pelos radicales de las más complicadas, al tratar de la absorción intestinal, al hablar de la alimentación de todas las células, etc., nos encontramos siempre con una membrana que separa dos líquidos o dos medios provistos de sales y compuestos en todos los estados de que hemos hablado, es decir, en los grados de disociación más variados, con iones y moléculas de tamaños los más diferentes ; lo cual hace que el problema biológico que encierra a todos ellos, como es el de la permeabilidad celular, sea uno de los más oscuros [1] que sólo mediante estos estudios se puede atacar.

Como conocimientos y consecuencias generales deducidos, creemos que es interesante hablar de *la presión osmótica en el reino animal* [2] : los animales llamados inferiores, como celentéreos, equinodermos, gusanos, crustáceos, moluscos ; entre los vertebrados los selacios poseen *la misma presión osmótica* que la del agua de mar que les rodea (en algunos grupos un poco inferior), y si se hace variar dentro de ciertos límites la concentración del medio en que viven, por ejemplo, evaporando el agua del mar o diluyéndola adquieren ellos prontamente la nueva.

Es decir, que no poseen ellos ningún procedimiento de regulación de su presión osmótica, como sucede en los animales llamados de sangre variable respecto a la temperatura. Los ganoideos y los teleosteos poseen en su medio interno una presión que es $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ de la de los anteriores o sea de la del mar. Los reptiles y los mamíferos que viven en el mar tienen las mismas presiones osmóticas que los terrestres, son estas presiones además constantes, es decir, independientes de las variaciones del medio. Los seres marinos fijos, corales y otros celentéreos fijos, esponjas, etc., no necesitan reguladores de su presión interna, pues el medio en que viven es casi constante, pero los peces

---

(1) En el capítulo VII se tratará de este asunto.

(2) Para ampliar respecto a métodos de trabajo sobre la presión osmótica celular, recomendamos al lector el libro *Die physikalisch-chemische Analyse der Pflanzenzelle (Osmotischer Druck, Bestimmung der Oberflächen-spannung)*, von V. GRAFE, Viena. En la parte 2.ª de la sección XI del *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden de Abderhalden.*

y demás seres marinos movibles sufren variaciones bastante grandes en la concentración de su medio al pasar de unas aguas a otras. Los peces, excepto los selacios, representan el tránsito entre los animales con presión osmótica variable y los de con fija, pues ellos mismos poseen ciertas variación interna según el medio.

Diálisis compensada

Es sabido que la diálisis se utiliza en los laboratorios para separar los cristaloides de los coloides ; pero en los líquidos orgánicos sucede a veces que la sal, el azúcar, etc., se halla en parte disuelto libremente, pero otra parte se halla unida a una substancia coloidal cualquiera, albuminoides, etc., sin que nos detengamos ahora a considerar el medio de unión, sea físico, químico o mixto, y nos conviene saber la proporción de tales cuerpos que se halla libre y la otra, para ello Michaelis y Rona han ideado lo que ellos llaman diálisis compensada que consiste en lo siguiente: Si se trata del azúcar, se coloca el suero en un saquito de pergamino, y fuera, en vez de agua pura, una disolución isotónica de sal común en la menor cantidad posible, a ésta en diferentes pruebas se le añade azúcar en concentraciones escalonadas ; aquella concentración del líquido exterior que no haya variado al cabo de algunas horas, representará la cantidad de azúcar *libre* del suero por unidad de volumen, es decir, el azúcar *dializable*. Si esta cantidad coincide con la total hallada por medios químicos, es señal de que todo el azúcar del suero es difusible, es decir, no unido con otros compuestos, albuminoides, etc., formando sales o asociaciones complejas. Según Rona, en el suero humano la mayoría del Na, K al estado de cloruro, fosfato y bicarbonato existente, está allí libre y perfectamente difusible. El calcio parece estar en $\frac{1}{3}$ ligado, formando, sin duda, un complejo indisociado e indifusible con los albuminoides.

Recordaremos, por último, como relacionado con este capítulo, las aplicaciones de antiguo conocidas de la Crioscopia en la clínica.

Capítulo IV

Caracteres eléctricos de los coloides

Muchas de las variaciones del estado coloidal (coagulación, precipitación por iones, etc.) son hoy atribuídas preferentemente a causas eléctricas, y es muy posible que con el tiempo se conozca que la influencia eléctrica se extiende mucho más de lo que hoy se cree en los fenómenos estudiados en la química de los coloides, por eso resulta imprescindible detenerse algo en estas cuestiones.

Lo primero que tenemos que conocer es que la mayoría de las partículas coloidales, y de las de los demás sistemas de dispersión poseen cierta carga eléctrica. De tal modo que si por cualquier medio, producimos en una solución coloidal una diferencia de potencial, haciendo, por ejemplo, pasar una corriente eléctrica a través del líquido, sea el agua, etc., en donde las partículas coloidales se mueven libremente, observaremos que éstas se dirigen hacia el polo opuesto al de su carga eléctrica. Este fenómeno se llama **electroforesis** o **cataforesis eléctrica.** El medio más sencillo de observarlo es tomar un tubo en U (fig. 23), llenarlo de una solución coloreada, sea de goma guta [1], de color lechoso, y lanzar la corriente, durante algún tiempo. Pronto, a los cinco o diez minutos, veremos que la rama del tubo que corresponde al cátodo (negativo) se decolora por completo, debido a que las micelas coloidales se han dirigido hacia la rama anódica o positiva que aparece, por el contrario, mucho más blanca, sobre todo alre-

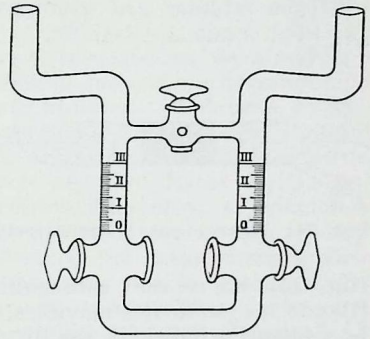


Fig. 23. Aparato para la medida de la velocidad de la cataforesis

[1] Tal solución se prepara, disolviendo 5 gr. de goma guta en 100 cm.³ de alcohol de 96°, se filtra, se toman 10 cm.³ de esa solución en un recipiente grande y se añaden rápidamente 200 cm.³ de agua destilada. Se forma un líquido lechoso que se filtra para quitar los copos excesivamente grandes.

dedor del polo +. De tal experiencia deducimos que este coloide está cargado negativamente. Si hubiéramos hecho la prueba con el hidróxido de hierro coloidal, la acumulación hubiese tenido lugar en el lado catódico y hubiésemos deducido de ello que sus partículas coloidales estaban cargadas positivamente.

Si impedimos que las partículas hagan su total camino llegando al polo correspondiente, poniendo antes de éste en el líquido un tabique transversal (porcelana porosa, arcilla, etc.) las partículas se acumularán contra él y entonces se observa que no pudiendo ellas pasar, provocan en ese lado un aumento de presión osmótica, por decirlo así, que tiende a ser equilibrada mediante la atracción del agua del lado opuesto. Se origina así una corriente de agua en sentido contrario al de las partículas, denominándose el fenómeno la **electrósmosis.** Puede demostrarse mediante el siguiente experimento

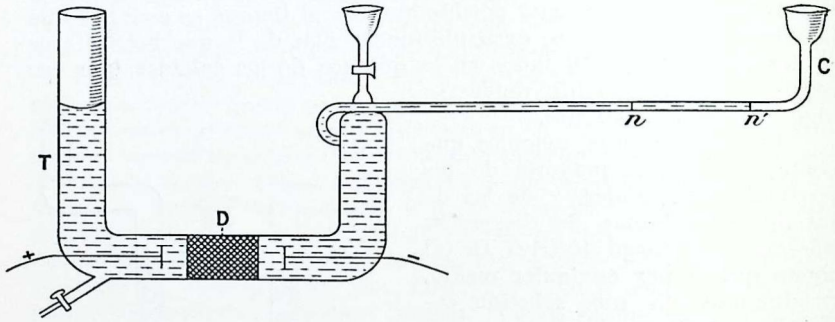


FIG. 24. Aparato para la demostración de la electrósmosis (según H. FREUNDLICH)

(fig. 24), en el cual conseguimos los resultados que obtendríamos fijando las partículas movibles, valiéndonos del artificio de sustituir la suspensión coloidal, sea de arcilla, por un tabique o tapón *D* de la misma materia porosa, cuyo tapón lo colocamos como lo indica la figura, en el punto medio del tubo en *V* (*T*). Quedará, por lo tanto, éste separado en dos compartimientos, mediante el tabique de arcilla *D*. Llenamos luego el tubo de agua, hasta que ésta alcance en el tubo capilar *C* un nivel fijo *n*. Colocamos en cada compartimiento y cerca del tapón *D*, un electrodo para poder lanzar una corriente eléctrica. Se da al tubo *C* una ligera inclinación (5-10°) de tal modo que el líquido en él alcanza un nivel dado *n* que se lee en su calibrado. Se convence uno que este nivel se mantiene constante y que el líquido en el capilar *C* puede, sin embargo, moverse libremente. Se cierra entonces el circuito con una corriente continua de 110 a 120 voltios. Al poco tiempo se observa un movimiento del agua que camina hacia el cátodo. Se cambia el sentido de la corriente, y el agua cambia en su corriente de sentido, siempre hacia el cátodo. La deducción es que

el agua está cargada positivamente, las paredes del tapón de arcilla negativamente. El movimiento del agua se precisa en la pipeta o tubo capilar *C* en donde se ve que su nivel sube o baja, de *n* a *n'*, por ejemplo, en el minuto 0,1-0,2 cm. Si las partículas de la pared de arcilla fuesen movibles no sería el agua, sino ellas las que se dirigirían al polo positivo.

Este caso de partículas que no se pueden mover se da en todos los sistemas coloidales sólidos (geles), por eso tienen importancia en biología estas corrientes acuosas provocadas por electrósmosis.

Variabilidad de la carga eléctrica

Una de las características de la carga eléctrica de los coloides es su variabilidad. LOTTERMOSER realizó la experiencia siguiente: preparaba una solución coloidal de yoduro de plata mezclando dos soluciones diluídas de NO_3Ag y de IK, y observó que si echaba la solución IK sobre la de NO_3Ag de modo que éste esté en exceso al principio, se formará un preparado coloidal de IAg positivo. Si por el contrario, echamos el NO_3Ag sobre el IK de modo que sea el último el que al principio está en exceso, resultará IAg coloidal negativo. Algunos coloides tienen pequeñísima carga eléctrica, como pasa con las soluciones cuidadosamente limpias de electrólitos, de almidón o de albuminoides. Otras, como el oro coloidal que camina normalmente hacia el polo positivo, puede, mediante la adición cuidadosa de sulfato alumínico, ser descargada permaneciendo en este caso inmóvil durante la electroforesis, y continuando el tratamiento indicado puede llegar a conseguirse que se dirija al polo negativo. Estas variaciones provocadas por la adición de electrólitos diferentes, a soluciones coloidales son frecuentísimas, llamándose al momento en que no hay emigración de partículas en la cataforesis, por estar descargadas, **punto isoeléctrico,** que coincide muchas veces con la precipitación de los coloides. Ahora bien; se ocurre en seguida proponerse esta cuestión: **¿por qué y cómo poseen los coloides tal carga eléctrica?** Al estudiar la electroforesis se piensa en un fenómeno de todos conocido, a saber, de la electrólisis. Todos sabemos que el paso de una corriente a través de una solución salina, sea de ClNa, provoca el cabo de algún tiempo, la acumulación de los iones electropositivos (aquí el Na) en el cátodo negativo, y la de los electronegativos (Cl) en el ánodo o positivo. ¿Podemos homologar los dos fenómenos? ¿Son las micelas coloidales iones? Comencemos por precisar.

Lo que entendemos por iones [1]

FARADAY fué el creador de esta palabra y la aplicó para denominar las substancias que aparecían en los polos en el fenómeno de la

[1] Estas ideas las podrá ampliar el lector en el artículo de Wo. OSTWALD, *Kolloide und Ionen*, en el *Kolloid Zeitschrift*, año 1923, cuad. 1, vol. XXXII y en el capítulo de esta obra sobre Electrólisis.

electrólisis. Cuando ARRHENIUS enunció su teoría de la disociación decía, como es sabido, que las moléculas de ácidos, bases y sales disueltas en un líquido, de elevada constante dieléctrica, como el agua, estaban no formando un todo reunido, sino *disociadas*. A los productos de esta disociación les llamó iones. Ellos poseen cierta carga eléctrica, por eso se conocen con el nombre de *iones electrolíticos*. Al pasar la corriente, ésta no disocia como creía FARADAY, las sales, pues éstas ya lo están, y son los iones los que transportan la corriente dirigiéndose con su carga eléctrica hacia uno u otro polo. Según las ideas clásicas de ARRHENIUS, existen en una disolución de una sal, moléculas disociadas en sus iones al lado de otras no disociadas, y el número de las ionizadas aumenta enormemente con el aumento de la dilución. Hoy en día, en vista de que era difícil darse cuenta del porqué en una solución unas moléculas estarían disociadas y otras no, se tiende a desechar esta concepción. Se supone que todas deben estar ionizadas, lo que varía con la dilución es la influencia recíproca de los iones, cuya movilidad aumenta con el aumento de aquélla. Sin embargo, prácticamente, como las cosas se explican igualmente aceptando cualquiera de las dos teorías, por estar más generalizada continuaremos con la primera.

Existen substancias que como el azúcar, no se disocian, no se ionizan. Si pretendiésemos hacer pasar una corriente por una disolución acuosa de él, veremos que opone una resistencia enorme, debido a que allí no hay iones, que son los que transportan la electricidad a través del líquido. Se dice que tales substancias *no son electrólitos*. Los *iones*, por lo tanto, según se entiende hoy en general tal palabra, *son portadores materiales y movibles de la electricidad*. La conducción de electricidad por ellos es, pues, *convectiva*, es decir, ligada a su movimiento. No es como la traslación de tal flúido a través de un metal en que no se verifica un desplazamiento material de partículas.

Qué grado de dispersión tienen los iones

Los iones electrolíticos citados, como los Cl y Na, pertenecen a los elementos de mayor dispersión dentro de los sistemas moleculares dispersos. Pero las mismas moléculas, las partículas coloidales, hasta las microscópicas, son también *iones*, puesto que al pasar la corriente por líquidos que los contienen, se mueven ellos conduciéndola en un sentido o en otro. Por lo tanto, se puede decir que : *existen iones de todos los grados de dispersión*. Pero hay que advertir que las leyes aplicables a los de un cierto grado de dispersión no lo son forzosamente, en modo alguno a los otros, así la ley de FARADAY de que : «cantidades químicamente equivalentes de diferentes substancias transportan la misma cantidad de corriente» vale para los iones moleculares dispersos o electrólitos, pero de ningún modo para los otros.

Por eso OSTWALD propone dar el nombre de *electrosomas* (1) a todos los portadores materiales y movibles de electricidad, aunque sean diferentes su grado de dispersión, sus propiedades químicas y las leyes a que están sometidos ; reservando el nombre de iones para los moleculares dispersos que obedecen a las leyes de FARADAY sobre la electrólisis.

Como ya vemos que existen electrosomas de muy diferentes grados de dispersión y propiedades, convendrá estudiar sus características que resaltarán muy bien, al estudiar las **causas de su carga eléctrica.** Al indagar sobre el motivo de la carga eléctrica de las partículas, se presentan varias posibilidades de aparición de diferencias de potencial eléctrico entre ellas y el líquido ; tales son :

1. **Potencial electrostático** : Entre las partículas en general y el medio de diferente constante dieléctrica (diferente poder conductor o resistente), al ponerse en contacto ambos, surge una diferencia de potencial, o potencial electrostático, como se llama. Según la regla de COEHN, la substancia con mayor constante dieléctrica es positiva respecto de la de menos.

Quizá se forme en la superficie separatoria una doble capa de electrones (2) (formación de dos polos) constituyendo lo que HELMHOLTZ llamaba la doble capa « Doppelschicht ». O quizá la carga eléctrica dependa como quiere JAFFE, para el caso del oleato de plomo coloidal disuelto en el *hexano*, de que recogería las radiaciones electrónicas que la atraviesan y entonces podríamos definir la constante dieléctrica como el coeficiente de repartición de los electrones, característico de las dos substancias.

2. **Potencial de disociación** : Es el caso típico de las soluciones moleculares de substancias en líquidos de gran constante dieléctrica, como el agua, etc., en donde muchas de ellas se disocian y originan iones con las dos cargas. Pero aun en el caso de dispersiones, en que las partículas estuviesen formadas por varias moléculas, sucede que se disocia la capa externa sólo, yendo uno de los iones al líquido ambiente y el otro queda unido a la parte, por decirlo así, no disuelta. Se forma así el potencial denominado de NERNST, provocado, como se ve, por lo que él llama la solubilidad específica de los iones o, sea por la repartición específica de éstos en el líquido y en la partícula. Es decir, que se da el caso, muy frecuente en los albuminoides, como veremos al tratar de éstos, como coloides, que la micela se disocia originando dos iones muy diferentes, uno pequeño y el otro mayor y más complicado, de donde vienen los nombres de *heteroiones* o *iones micelares*.

3. **Potencial debido a la adsorción**: Surge en sistemas polidispersos, es decir, en líquidos donde existen al mismo tiempo partículas

(1) Aunque esta denominación no ha sido generalmente aceptada, la indicamos para marcar mejor las diferencias entre las distintas clases de iones.

(2) Electrones son las menores cantidades posibles de electricidad ; son, por decirlo así, « el átomo eléctrico ».

microscópicas o coloidales y, por otra parte, moléculas disociadas en sus iones, y entonces sucede que hay una adsorción (1) específica de iones por las partículas más grandes, quedando unos retenidos en la superficie de éstas y los otros libres a su alrededor.

4. **Potencial electrokinético**: Es decir, el debido al rozamiento de las partículas que, como sabemos, están en continuo movimiento con el líquido ambiente, y es claro que fácilmente se alcanza la idea de que puedan aparecer así diferencias de potencial entre las dos superficies. Según FREUNDLICH se comporta este potencial como el de adsorción.

5. **Otros potenciales**: Si se tiene en cuenta que además de éstos pueden aparecer otros, debidos a reacciones químicas, radicaciones, pulverización mecánica, etc., fenómenos todos capaz de producir cierta carga eléctrica de las partículas, se ve que las leyes a que obedezcan tan diferentes modos puedan ser diferentes. Es más, se da el caso, como ha demostrado FREUNDLICH, de que en una misma superficie existan dos potenciales de origen distinto y, por lo tanto, de diferentes propiedades, como, por ejemplo, el de NERNST y el electrokinético. Se ve, por lo tanto, que sólo una de las causas de la carga eléctrica de las partículas, como es la de la disociación electrolítica, no pueda hoy en modo alguno explicar todas las características eléctricas de aquéllas en los diferentes sistemas dispersos.

Explicación de los caracteres eléctricos de los coloides partiendo de estos conocimientos

1.° Los electrosomas coloidales pertenecerían, desde el punto de vista de la teoría de la disociación, a los llamados heteroiones. Las micelas coloidales se disociarían en dos o más iones muy distintos, en un catión o un anión enorme (electrosoma coloidal) y en uno o muchos verdaderos iones del signo contrario y de tamaño pequeñísimo, dentro éstos, desde luego, del correspondiente a la dispersión molecular. Su disposición correspondería a la citada « doble capa » cada una con su signo eléctrico y concéntricas ambas. Esta disposición crea el potencial que según su origen será debido a distintas causas, adsorción, solubilidad específica de los electrones, etc.

2.° Una consecuencia interesante de tal concepción es la explicación del hecho que al pasar la corriente por una solución coloidal *veamos sólo la* **emigración de los iones,** *o mejor dicho electrosomas grandes,* es decir, de los de tamaño coloidal, y por eso decimos que tal coloide es positivo o negativo, pero esto no quiere decir que no haya emigración simultánea en sentido contrario de los de signo opuesto ; la hay, pero por tratarse de iones pequeñísimos no apreciamos inmediatamente su emigración.

(1) Véase capítulo sobre Adsorción.

3.° Hemos dicho que las partículas coloidales *cambian con facilidad de signo.* Es claro, que según el origen de su carga será diferente la causa de tal variación ; así, si aquélla es provocada por adsorción de iones electrolíticos, según sea el signo de éstos así será el de la partícula que los retiene. Si la causa del potencial fuese la diferente constante dieléctrica entre el líquido y la micela, según la regla de COEHN, así variará la carga de ésta. Y volviendo al caso de la adsorción, puede suceder que ciertos iones del líquido arrojen a otros de la superficie de la micela que los tenía adsorbidos y los sustituyen, cambiando fácilmente el signo de aquéllas.

4.° También se explica bien la **variabilidad de su carga eléctrica en cantidad.** Sabemos que los iones moleculares dispersos tienen ya como rareza 5 o más cargas elementales. Los coloides, en cambio, pueden llevar 100 y más cargas elementales o electrones. HEVESY calculó la carga de un coloide de 50 $\mu\mu$ en 2000 electrones. Quizá esto sea una diferencia casi esencial entre los electrosomas coloidales y los verdaderos iones, y como hemos visto que añadiendo a una solución coloidal diferentes electrólitos podemos quitar dichas cargas eléctricas de los coloides, cabe el disminuirlas, hacerlas nulas y el cambiarles de signo. Añadamos que al desposeerlos de sus cargas, al hacerlos alcanzar el punto isoeléctrico que se llama, los suspensoides en su mayoría se precipitan, probablemente porque ya no se repelen y desaparece así la causa que los retenía en suspensión (disolución).

5.° **La velocidad de emigración de los electrosomas en la cataforesis es muy variable.** Suele decirse en los libros que esta velocidad (1), sea cualquiera el grado de dispersión, es de 3-5 $\mu\mu$ por segundo. Pero esto es sólo aproximado, pues ya se sabe que entre los iones verdaderos existen algunos con velocidades típicas y enormes, como sucede con los H y con los OH iones. Aquel dato se refiere al caso de las velocidades *máximas* de electrosomas en agua y entonces si que no difieren mucho entre sí, ni dependen mucho de concentración, temperatura, etc. Pero es evidente que por debajo de aquéllas pueden encontrarse todas las cifras desde varias μ a 0, que es el caso de su inmovilidad en el punto isoeléctrico. Y es precisamente en este aspecto en el que más se diferencian los diferentes tipos de coloides, así los coloides que varían fácilmente en su grado de dispersión y que en soluciones diluídas se comportan como los electrólitos moleculares dispersos, al disminuir en su dispersión, originan soluciones de caracteres mixtos muy curiosos. Así, por ejemplo, poseen una conductibilidad eléctrica grande que parece denunciar una dispersión muy grande casi molecular todavía, y en cambio, sus propiedades osmóticas calculadas por el punto de congelación, tensión del vapor, etc., revelan por el escaso valor de la presión debida a la ósmosis, la existencia de pocas partículas, lo cual no concuerda con la admisión de una gran dispersión. La explicación de tal contraste debe radicar en que las

(1) Velocidad ocasionada por la diferencia de una unidad de potencial entre dos puntos.

partículas deben ser pocas y, por lo tanto, grandes como lo indica la ósmosis; pero, en cambio, deben ser muy movibles, lo que explica su gran conductibilidad eléctrica. En efecto, se ha visto que la movilidad de iones grandes coloidales de jabón, es muy semejante a la de los iones verdaderos de potasio.

Aplicaciones de estos conocimientos

Ya hemos dicho que en la explicación de los fenómenos coloidales se aplican las teorías eléctricas constantemente; basta leer un libro sobre coloides para convercerse de ello. Pero en Biología tienen un interés directo muy especial estas cuestiones, por lo que pueden tener de aclaratorio, para la explicación de formación de corrientes eléctricas en los tejidos, y probablemente para aclarar hechos como los referentes a la contracción muscular, transmisión de excitaciones e impresiones, etc.

Los estudios eléctrico-biológicos han ido muy a menudo juntos con los de la física pura y físico-química respecto a la producción de electricidad en general. Tanto en los tiempos antiguos, que comienzan con los clásicos experimentos de Galvani, como en los más modernos que consisten en buscar pares eléctricos que puedan imitar a los naturales de los tejidos; es decir, prescindiendo de metales y electrólitos que no existen en el organismo, e investigando, en cambio, las diferencias de potencial engendradas en el contacto de dos fases no miscibles, aceite y soluciones acuosas, membranas y soluciones en contacto, etc., que se acercan más a los posibles generadores eléctricos de nuestro ser, tanto en uno como en otro caso, como decíamos, se confunden los campos del físico y del biólogo.

Los primeros pasos de la investigación de la producción de corrientes en el organismo, los representan las experiencias de Galvani, quien demostró que un músculo se contrae, cuando se le toca con los dos extremos de un arco, formado por dos metales diferentes Zn y Cu soldados entre sí por los otros extremos. El creía, y es cierto, que la causa de la sacudida muscular era la producción de una corriente eléctrica; pero se equivocaba al suponer que era el mismo músculo el que se la producía, merced a una fuerza vital existente en su interior.

Volta construyó su elemento primitivo, introduciendo dos láminas, una de Cu y otra de Zn. en una solución ácida, al reunir los dos metales mediante un conductor por fuera del líquido, se producía una corriente y entonces comparando la experiencia de Galvani con la suya, él asignó al músculo el papel del líquido electrólito. ¿Dónde y cómo se producía esta corriente? Es más bien cuestión interesante para los físicos. Para los biólogos, representan un avance importante los experimentos de Du Bois-Reymond, que demostró por primera vez y 50 años después de Volta, que los tejidos orgánicos engendran

de por sí corrientes eléctricas, llegando a medirlas con aparatos más perfeccionados. Observó que en un trozo de tejido, aparecen diferencias de potencial engendradoras de corrientes, cuando éste presenta una superficie herida y otra íntegra yendo la corriente de la herida a la no alterada. Vió que la fuerza electromotriz engendrada alcanza de $^1/_{10}$ hasta $^1/_{50}$ de volt. No alcanzó a dar con la causa de la corriente, pues fracasó al intentar producir pares eléctricos con elementos conocidos semejantes a los naturales y por eso inventó su *teoría molecular*. Suponía que en los tejidos existen partículas pequeñísimas, cargadas en un lado de electricidad positiva y en el otro de negativa, las llamaba moléculas electromotrices, y las creía orientadas en el músculo sano, de modo que unas con otras se neutralizan; la herida viene a romper este equilibrio, y aparece con ello exteriorizada su fuerza electromotriz. De su tiempo son los trabajos de Hermann que, habiendo demostrado que los tejidos intactos no producen corrientes, coincidía con el anterior en atribuir a la *alteración* la causa primordial de ellas.

Una orientación imprevista surgió al publicar Ostwald, en 1890, sus observaciones sobre las propiedades eléctricas de las membranas llamadas de « precipitación » utilizadas en los trabajos entonces tan en boga sobre la ósmosis, « Niederschlagsmembranen ». Se supuso que en los organismos no se producen fuerzas electromotrices, en la superficie de contacto de diferentes soluciones acuosas existentes en los tejidos, sino más bien en las capas existentes entre ellas, separándolas, es decir, en las membranas semipermeables. Ya el mismo Ostwald indicó que sus estudios serían aplicables a la Biología. Explica la formación de corrientes, diciendo qe tales membranas semipermeables se dejan atravesar de modo diferente unas más fácilmente que otras por los iones positivos y los negativos, con esto se producirían acumulaciones de cargas eléctricas distintas en ella y aparecerían fuerzas electromotrices engendradoras de corriente. *La teoría de la membrana* de Ostwald dió origen a muchísimos estudios por parte de fisiologos y físicos, especialmente por parte de su discípulo Cremer.

Bien pronto se demostró su insuficiencia para aplicarla a todos los casos, y aparecen los trabajos de Nernst y Haber, que inician el período actual de experimentación, al crear la teoría de la fuerza electromotriz producida en el límite de dos electrólitos conductores no miscibles, es decir, que las leyes descubiertas por el primero eran aplicables no sólo a las corrientes producidas en el límite entre metales y soluciones, sino también a las engendradas en el límite entre líquidos no acuosos y soluciones acuosas conductoras.

Resumiendo los resultados logrados hasta hoy en electrofisiología, se puede decir, que se desconoce hoy la causa precisa de las corrientes eléctricas biológicas, y que de todo lo anterior quedan como resultados interesantes, el dato negativo de que sólo los líquidos acuosos no pueden bastar para buscar allí la solución de tal causa, y los

positivos de las experiencias sobre la teoría de la membrana, y de las de la orientación iniciada por NERNST y HABER.

Hoy la experimentación va en el sentido últimamente expuesto, es decir, se tiende a bucar las fuentes de electricidad del organismo, construyendo elementos galvánicos de nueva especie, o sea substituyendo los metales y soluciones, por productos orgánicos diferentes. En una palabra, se procura imitar los fenómenos eléctricos naturales, valiéndonos de substancias sintéticas (1).

(1) El lector encontrará datos muy interesantes sobre esta cuestión en el libro de R. BEUTNER, discípulo de J. LOEB, titulado : *Die Enstehung Elektrischer Ströme in Lebenden Geweben*. Editor, Ferdinand Euke. Stuttgart, 1920.

CAPÍTULO V

Variaciones del estado coloidal

Denominaciones usuales

Siendo los coloides un estado de dispersión posible de la materia, comprenderemos que pueden sufrir variaciones en su grado de dispersidad que se realizarán unas veces dentro de los límites del estado coloidal, o que por salirse de él, conducirán a estados pertenecientes a los sistemas de dispersión grosera, por una parte, o al de dispersión molecular, por otra. La disminución de la dispersión de los coloides que conduce hasta la formación de partículas pertenecientes ya, por su tamaño, al sistema de dispersión grosera, se llama *coagulación*. Suele llamarse a las soluciones coloidales no coaguladas, *soles*, y a los productos de la coagulación, *geles*. El proceso inverso, por el cual se aumenta la dispersión, hasta llegar al estado molecular se llama *peptización*, por la analogía, sin duda, con la disolución que sufren los albuminoides sólidos, cuando bajo la acción de los fermentos pasan a peptonas.

En el capítulo I, se dijo que entre las diferentes combinaciones que con los medios dispersante y disperso se pueden teóricamente establecer, dos nos interesan prácticamente sobre todo, y éstas serán la de sólido en líquido y la de líquido en líquido dando origen a las dos grandes clases de coloides que hemos llamado *suspensoides* y *emulsoides*. Modernamente, creen algunos más en conformidad con los hechos, el basar la diferencia entre ambas clases en la mayor o menor afinidad del coloide para con el medio dispersante llamamndo a los primeros *liófobos* o *hidrófobos* y a los segundos *liófilos* o *hidrófilos* (si se trata del agua), pues es posible que el modo de ser de algunas partículas coloidales dentro del mismo medio de dispersión varíe entre el estado sólido y el líquido, observándose de hecho todos los tránsitos posibles entre ambos estados. Esto es aplicable sobre todo para los *emulsoides solvatizados*, es decir, para aquellos cuyas partículas las llevan adheridas una capa más o menos grande del medio dispersante. Y del mismo modo que un trocito de goma arábiga, según el agua que absorbe pasa por todos los tránsitos desde un sólido duro y quebradizo hasta un líquido flúido, así las partículas coloidales menos hidratadas, pueden experimentar tales cambios que se denominan : *imbibición de las partículas* y *gelatinización*.

Es evidente que todas estas variaciones citadas no son necesariamente independientes las unas de las otras, ni las únicas que los coloides pueden experimentar. Sino que muy a menudo se presentan combinadas entre sí, sobre todo en los procesos biológicos. Hay que advertir también que tales variaciones son graduales, es decir, que se puede, por ejemplo, coagular un albuminoide por grados, haciendo que en la solución que lo contiene aparezca primero un enturbiamiento apenas perceptible, luego más claramente visible, luego muy fuerte, y veremos que pronto comenzará la formación de un precipitado, llegando, por fin, a la coagulación total. Lo mismo diríamos para cualquier otro cambio.

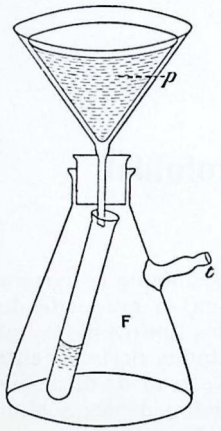


FIG. 25. Ultrafiltración sencilla (según OSTWALD)

Se toma un papel filtro de la forma *p*, que los vende así ya la casa Schleicher & Schüll o uno ordinario. Se coloca bien en un embudo, se le humedece con agua caliente, se deja escurrir el agua del todo, y sobre el filtro húmedo se echa una solución de colodión al 4 %, se deja escurrir ésta, y haciendo girar el filtro horizontalmente, se deja secar durante 5-10 minutos, con lo que queda recubierto de una fina capa de colodión. Se repite nuevamente la operación con el colodión al 4 % y una vez seco al cabo de otros 10 minutos, se puede separar el papel vuelto rígido y, en seguida solo o con el filtro, se introduce en agua destilada durante 10 minutos. Se prueba su calidad con colargol o rojo de Congo. Se aumenta la velocidad de la ultrafiltración mediante el frasco *F* del que por el tubo *t* se extrae el aire mediante una pompa de agua

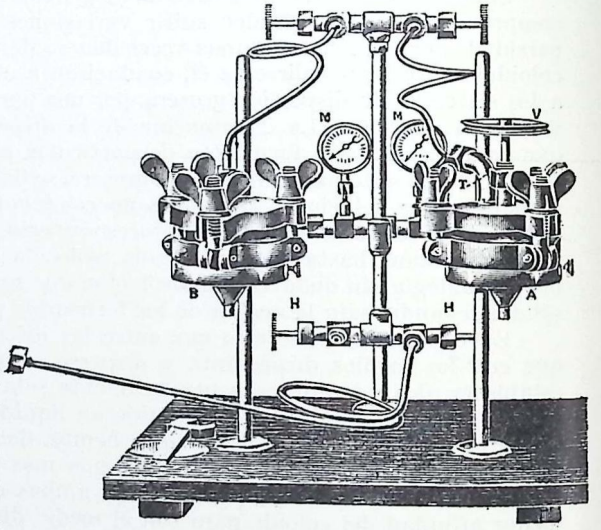


FIG. 26
Aparato para la ultrafiltración (según H. BECHHOLD)

Como ultrafiltros (*F* de la fig. 27) pueden servir sencillos discos de papel filtro impregnados de gelatina; poniendo un papel debajo pueden usarse en este aparato a presiones de 20 atmósferas. La casa Schleicher & Schüll en Düren vende ultrafiltros ya preparados en paquetes de a diez (diámetro 9 cm.), encerrados en cajas de aluminio llenas de agua, cerradas perfectamente con un anillo de caucho. Vende seis clases de ultrafiltros según la finura deseada para la ultrafiltración

Las variaciones en el grado de dispersión pueden seguirse por medio del ultramicroscopio, viendo como en efecto aumenta o disminuye el tamaño de las partículas. Por medio de la ultrafiltración

se pueden separar partículas de diferentes tamaños, valiéndose de filtro cuyos poros varían gradualmente (figs. 25, 26 y 27). Existen ya diferentes casas que preparan filtros que permiten no ya separar las suspensiones de los coloides, sino éstos entre sí, según su tamaño.

También por procedimientos indirectos, como apreciaciones de cambios de color, de conductibilidad eléctrica, de enturbiamiento, de viscosidad se pueden delatar y seguir procesos de cambio de dispersión.

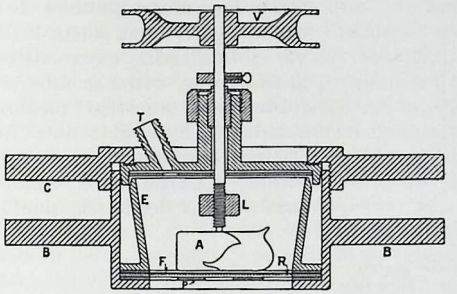


FIG. 27. Corte de uno de los ultrafiltros del aparato anterior

B, cilindro de acero, que se puede cerrar herméticamente a rosca mediante la pieza de acero *C*. Dentro de la caja así cerrada está el embudo *E*, cuyo suelo está constituído por la lámina *F* ultrafiltro. Para aumentar la filtración se inyecta en el embudo *E* en que está el líquido para filtrar, aire o nitrógeno a presión, por medio del tubo *T*. Para que no se rompa el filtro *F*, se apoya éste sobre una red metálica *R*, apoyada a su vez sobre una lámina de níquel agujereada *P*. El líquido a filtrar se agita mediante el agitador *A*, movido desde fuera mediante la rueda de polea *V*

Sobre todo, tales variaciones presentan características más marcadas en los coloides que hemos llamado *emulsoides* solvatizados, como, por ejemplo, en las soluciones coloidales de gelatina, de albuminoides, de caucho, de celulosa, etc., y la propiedad físico-química que nos puede servir mejor como indicador de tales variaciones internas, es la de que vamos a tratar brevemente, es decir

La viscosidad

Se aprecia con precisión por los viscosímetros (fig. 28), pero todos conocemos tal propiedad y sabemos distinguir sin aparatos si tal líquido es más viscoso que otro. La gran movilidad de un líquido es decir, su *fluidez* denunciadora de poco rozamiento interno, nos da idea de su poca viscosidad y viceversa. Fluidez y viscosidad son, pues, cualidades antogónicas de un líquido. Se diferencian mucho los suspensoides de los emulsoides, desde este punto de vista como desde otros muchos (fig. 29). Los primeros, como el oro, sulfuros metálicos coloidales, etc., hacen variar muy poco la viscosidad de su medio de dispersión. Este resulta prácticamente tan movible puro, que con concentraciones

pequeñas, y si aumenta la concentración del coloide, la viscosidad del líquido aumenta en proporción aritmética sencilla. En cambio, los coloides hidrófilos o emulsoides gelatina, albúmina, etc., hacen aumentar mucho la viscosidad del dispersante, y ya en pequeñas concentraciones comunican gran viscosidad a sus soluciones, y esta cualidad se hace en seguida enorme, en cuanto aumenta un poco la concentración del emulsoide. Una solución de gelatina recorre, dentro de concentraciones que no exceden del 2 % todos los valores posibles de la viscosidad, desde la del agua hasta la de la gelatina, ya solidificada, cuya viscosidad es tan grande, que, como se sabe, es inconmensurable para nuestros medios de medida, siendo su movilidad nula. Ambas características corresponden ya a las del estado sólido. Existen otros emulsoides todavía más activos desde este punto de vista.

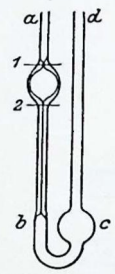


FIG. 28. Viscosímetro según WILHELM OSTWALD (1/6 del natural)

Se vierte agua en *d* hasta llenar la esfera c, se mide bien el agua empleada; sean 5 cm.³ Se sopla por *d* hasta que el líquido haya subido en *a* un poco por encima de 1. Se deja *d* libre y con un cronómetro que marque 1/5 de segundo, se cuenta el tiempo que tarda el agua desde que enrasa en 1 hasta enrasar en 2. Se repite entonces la operación con el líquido o solución a medir utilizando siempre 5 cm.³ exactos, y este tiempo hallado se refiera al del agua que se toma como unidad. Como la temperatura influye mucho, debe trabajarse a temperatura constante, lo mejor es hacerlo todo con el viscosímetro introducido en un baño de agua caliente

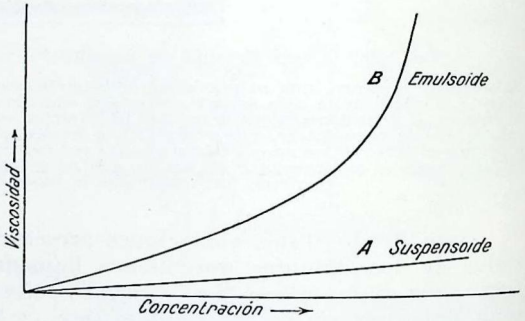


FIG. 29
Esquema de la relación entre la viscosidad y la concentración en los coloides (según Wo. OSTWALD)

Influencia de la temperatura y de otros agentes sobre la viscosidad de las soluciones coloidales. Para las soluciones moleculares, sabemos que la viscosidad disminuye a medida que aumenta la temperatura; para el agua pura esta disminución tiene un valor de un 2 % por grado, dentro de los 25 primeros. Las disoluciones de gelatina experimentan una disminución en su viscosidad enormemente mayor al elevar su temperatura. Para ciertas concentraciones de la última basta un aumento de muy pocos grados para licuar una solución cuajada cuya viscosidad es máxima (sólido), haciéndola pasar a ser un líquido movible cuya viscosidad es fácilmente medible por los métodos ordinarios. Es preciso advertir que en este caso ha habido una variación

continua de viscosidad y no una transformación discontinua, como se observa al fundirse un cristal.

Bastan influencias menos profundas, pequeñas sacudidas y otras causas mecánicas para disminuir la viscosidad de los emulsoides solvatizados. A veces sólo por la acción del tiempo se aprecian tales variaciones, por ejemplo, aumento de tal cualidad en las soluciones de gelatina, disminución en las de almidón. Y desde luego la adición de substancias electrólitos y no electrólitos tiene gran influencia como modificadora de la viscosidad, sucediendo que una sola substancia, según su concentración, puede aumentar o disminuir esta propiedad. Todas estas variaciones de la viscosidad corresponden a variaciones en el estado coloidal, sea en el grado de dispersión, sea en el modo de ser de la fase dispersa y de su estado de hidratación, etc. Así, hemos dicho que las disoluciones de almidón se hacen menos viscosas con el tiempo; pues bien, por el ultramicroscopio y otros medios se aprecia que tal disminución es paralela, a una disminución del grado de dispersión y a una deshidratación de la fase dispersa.

Es decir, las micelas o partículas coloidales, ceden espontáneamente, al menos en parte, su agua, y se reúnen en complejos mayores, es como un paso del estado líquido al sólido de tales partículas. Por el contrario, las soluciones de albuminoides bajo la acción de ácidos y de álcalis en ciertas concentraciones se hidratan, y con ello las partículas coloidales tienden al paso del sólido al líquido con el correspondiente aumento de la viscosidad de la solución. En otros casos es desconocida la variación interna correspondiente a la de la viscosidad, como sucede al enfriarse una solución de gelatina y cuajarse. Para explicar W. OSTWALD el pasmo de una solución de gelatina caliente al enfriarse, y el enorme cambio de viscosidad que allí se aprecia, que pasa de la de un líquido movible a ser de la de un sólido con forma propia (una gelatina), hace el siguiente experimento, base de su

Teoría de la gelatinización. Mezcla dos líquidos, que son sólo parcialmente miscibles a la temperatura ordinaria. El uno es fenol que contiene un poco de agua, el otro es agua con un poco de fenol disuelto (toma del primero, próximamente el 36 %), y los agita hasta que se forme un líquido lechoso que es, como se sabe una verdadera *emulsión*. Una vez formada, al mismo tiempo que la agita va calentándola y observa que la emulsión se aclara poco a poco llegando a hacerse del todo clara a 70°. A partir de esta temperatura llamada *crítica*, ambos líquidos son del todo miscibles, como lo prueba el hecho de que añadiendo cualquiera de los dos separadamente sigue la mezcla del todo clara. En una palabra, a partir de 70° se ha formado una *solución molecular* de ambos líquidos entre sí y esta solución subsiste en cualquier proporción. Al enfriarse, bien agitándola en el aire o por la acción de una corriente de agua fría, vuelve a verificarse una separación de ambos líquidos; por decirlo así, se «desenmezclan». Al

principio, el líquido se hace opalescente, como lo es una solución coloidal de goma guta o de albúmina de huevo, de lo cual se puede deducir que tal estado de separación o segregación de líquidos corresponde a una fase coloidal del sistema fenol-agua, como en efecto lo prueba la observación ultramicroscópica. Enfriando más, se forma luego una emulsión, que se aprecia exteriormente por un enturbiamiento y, por fin, llega una separación completa de ambos líquidos.

Estas **mezclas críticas** de líquidos presentan, como las soluciones de ciertos emulsoides solvatizados (gelatina), la propiedad de dar espumas y sobre todo adquieren en el momento de la opalescencia que corresponde al estado de dispersión coloidal, el *máximun de viscosidad*. Esto las distingue de los demás líquidos cuyo aumento de viscosidad está dentro de ciertos grados, alrededor de la temperatura crítica, y al enfriarse más vuelve rápidamente a bajar (figura 30). Es notable que la viscosidad de la mezcla en el momento de la opalescencia es mucho mayor que la de los dos componentes tomados separadamente. La fase de enturbiamiento denunciador de un grado de dispersión menor, ya es dispersión grosera (emulsión), sigue a la de la opalescencia y su viscosidad es tambien menor. Compara estas mezclas con las soluciones de emulsoides solvatizados, como la de gelatina, y dice que el gran aumento de viscosidad que adquieren aquéllas al enfriarse y adquirir cierta temperatura, corresponde al gran aumento de viscosidad que se aprecia al cuajarse por enfriamiento una solución de gelatina y que así como en el primer caso se trata de la separación de la mezcla primitiva en dos fases, así también la solución de gelatina se separa en otras dos, una coloidal concentrada con poca agua y la otra acuosa con poco coloide. Para otros emulsoides solvatizados la separación conduce hasta la formación de cristalitos, bien en seguida o bien al cabo de cierto tiempo. En este caso las gelatinas que se forman, caso del ácido silícico, de ciertos jabones, etc., son menos elásticas que en el de la gelatina típica en la que nunca se observa la formación de cristalitos. Pero siempre la

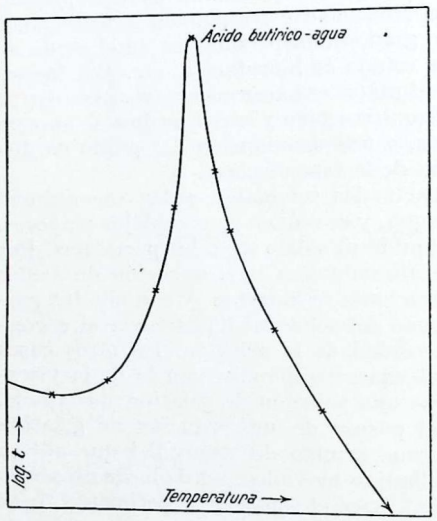


Fig. 30. Viscosidad de una mezcla crítica de líquidos (según Wo. Ostwald)

formación de tales geles es un proceso de separación del líquido primitivo en dos partes de muy diferente contenido, disminuyéndose el grado de dispersión y apareciendo claramente dos fases, una formada por partículas coloidales de gran concentración, pues llevan muy poca agua, y otra el agua restante que lleva disuelto muy poco coloide. La viscosidad de esta mezcla es tan grande que adquiere forma propia, se solidifica (fig. 31).

Pero en el caso de la mezcla de líquidos, tomado como ejemplo, continúa la separación de ambas partes después de haber alcanzado el máximum de viscosidad en el estado coloidal, y hemos visto que

Fig. 31

Esquema de M. Fischer para explicar el paso de sol. a gel. por descenso de temperatura en ciertos casos

En *A* las dos fases reunidas forman un líquido a la temperatura de comienzo, por ejemplo, el jabón (oleato potásico en agua). El jabón está disperso molecularmente o iónicamente. Al bajar la temperatura, por disminuir la solubilidad del jabón en el agua, se llega a la saturación en ciertos puntos, y se forman progresivamente, partículas coloidales cada vez mayores en *B, C, D, E, F*. Pero todavía se debe considerar al agua como medio que disuelve *(dispersante)* y el jabón como la fase disuelta *(dispersa)*. Si el coloide es liófilo o hidrófilo como en este caso, es decir, que encierra algo de agua al bajar más la temperatura, se reúnen entre sí las micelas, de tal modo que en el nivel *Z* se puede considerar al jabón como medio que disuelve *(dispersante)* y al agua como la fase disuelta *(dispersa)*. Este estado pasa al anterior creciendo los espacios de agua (los claros) como se ve en el esquema desde *Z* hasta *V*. En *Y, X, W, V* y *U* hallamos, pues, una dispersión de una solución de jabón en un jabón solvatizado. Ambas zonas son, por lo tanto, emulsiones de idéntica composición química y de muy diferentes propiedades físicas. La *B, C, D, E, F* representarían una emulsión de aceite en agua; la *Y, X, W, V, U* de agua en aceite. La primera se mezcla fácilmente con agua, moja el papel y tiene cierta viscosidad que crece de arriba abajo; la segunda se mezclaría sólo en aceite, engrasaría el papel y tiene enorme viscosidad. Lo primero es un coloide líquido, lo segundo una gelatina

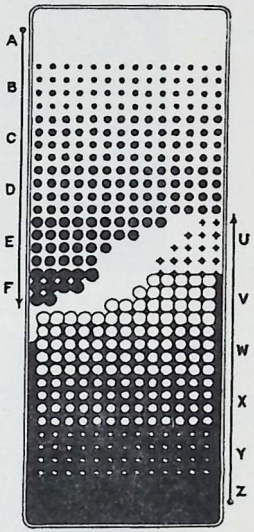


Fig. 31

pasa al estado de dispersión grosera y que, por fin, se separan los dos compuestos líquidos de la mezcla. Y en cambio, la gelatina cuajada (máximum de viscosidad) parece que no pasa de este estado; sin embargo, si se la deja en reposo varias horas o mejor días, en condiciones de asepsia, aparece en efecto una separación de ambas fases. Los bacteriólogos conocen este hecho, pues observan en sus gelatinas de agar, que al cabo de días se separa un líquido que lo suelen llamar agua de condensación, y no es tal agua, es un líquido segregado por la gelatina que representa una disolución diluída de los constituyentes de aquella, tanto de los coloides como de los moleculares dispersos; tiene, por lo tanto, la misma composición que la gelatina, sólo que en concentración mucho menor, lo mismo que decimos para la mezcla

de líquidos. Este proceso lo llamó GRAHAM synéresis. Según OSTWALD, no ha encontrado él gelatinas que no segreguen este suero. En el Instituto para coloides de Leipzig, se conserva una de estas gelatinas en un frasco de ERLENMEYER, cerrado hace ya varios años (fig. 32), y el suero segregado representa ahora quizá $^2/_3$ del volumen primitivo de la gelatina, hoy ésta, que conserva la forma contraída del frasco, nada dentro del suero. Este fenómeno representa el tercer tiempo del proceso de separación de la primitiva solución, cuyo momento intermedio corresponde al máximun de viscosidad, en el estado coloidal de la mezcla de los líquidos y en el de la gelatinización de la mezcla de que tratamos. OSTWALD concede mucha importancia teórica y práctica al fenómeno de la synéresis y, sin embargo, como él mismo indica en las observaciones finales de su libro, parece que no es objeto de la atención de los investigadores actuales, hasta el punto de que en muchos libros sobre coloides no se trata de él. Ya hablaremos luego de algunos hechos biológicos que parece que pueden explicarse por él.

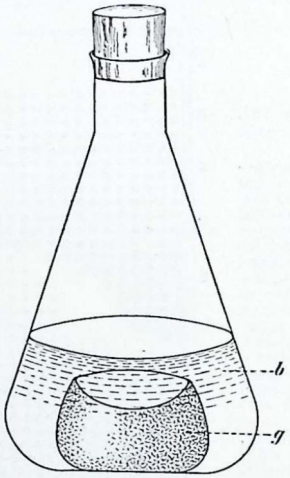


FIG. 32. Sinéresis de una gelatina viscosa. (Dibujo según una fotografía de WO. OSTWALD)
l, parte líquida;
g, la gelatina contraída

Anillos de Liesegang. Sabemos que en las gelatinas se difunden las soluciones moleculares; de esto se deduce que en su seno se pueden realizar reacciones químicas entre dos substancias disueltas molecularmente difundidas en ella. Echamos en la mitad inferior de un tubo de ensayo una solución de gelatina que contiene, por ejemplo, bicromato potásico, se deja enfriar y, por lo tanto, cuajar la gelatina, y entonces se vierte encima una solución de nitrato argéntico y se deja así, ambas substancias se difundirán mutuamente. En especial el nitrato pasará a la gelatina, como hemos indicado para la difusión de substancias disueltas en ésta, y también como lo haría en una solución pura de bicromato potásico. Lo mismo que en este último caso se producirá un precipitado de cromato de plata, que será tanto más abundante cuanto la difusión esté más adelantada. Pero aquí sucede algo muy especial que no sucede en una difusión libre. Si no hubiese gelatina, la cantidad de precipitado aumentaría continuamente conforme a los progresos de la reacción. En cambio, aquí observamos una *precipitación periódica*, como se ve en la figura 33 en donde se aprecian los anillos o mejor las capas de cromato de plata separadas por zonas claras en las que no se ha formado el precipitado.

También otras reacciones con formación de precipitados producen el mismo fenómeno. Y se puede hacer también la experiencia sobre placas de gelatina en cuyo centro depositamos una gota del nitrato de plata en su centro; observándose entonces una serie de anillos concéntricos del precipitado. A estos anillos se les llama, según su descubridor, *anillos de Liesegang* (fig. 34). Se obtienen mucho mejor usando determinadas concentraciones, y aunque son varias las hipótesis expuestas para su explicación, la teoría de su formación está lejos de ser del todo conocida, por lo tanto, las esperanzas que se abrigaron al principio de que pudiesen servir de base para explicar estructuras semejantes existentes en la Naturaleza, como la estructura zonal de las ágatas, calcedonias, zeolitas, huesos, cálculos renales (fig. 35), hepáticos, etc., no han resultado satisfechas.



FIG. 33
Precipitación periódica de cromato de plata
(según F. STOFFEL)

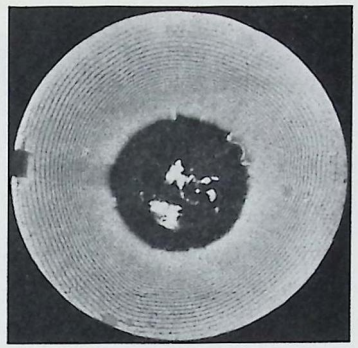


FIG. 34. Anillos de LIESEGANG



FIG. 35. Cálculo urinario (tamaño natural) con capas concéntricas y radiadas. Según FRISCH y E. ZUCKERKANDL. Dibujo de H. SCHADE

El estado de gelatina se puede alcanzar también partiendo no ya de soluciones, sino de substancias en estados mucosos o gelatinosos secos, y perfectamente sólidas, basta para ello someterlas al pro-

ceso contrario, es decir, humedecerlas y entonces observaremos el fenómeno que todo el mundo conoce con el nombre de

Hinchamiento por imbibición (Quellung, de los alemanes).[1] (fig. 36). El mejor medio de observarlo es cortar varias tiras de gelatina, de igual largura y espesor y colocarlos en sendos tubos de ensayo, uno de ellos se deja en seco, y a los demás se les añade agua acidulada en diferentes proporciones. Al cabo de veinticuatro horas se observa

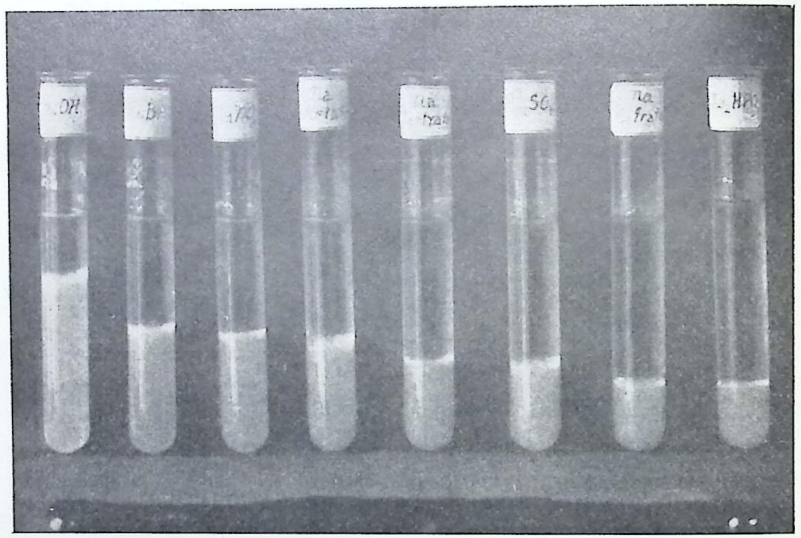


FIG. 36. « Quellung » de fibrina en diferentes soluciones de sales sódicas ($^1/_{10}$ mol.) (según M. H. FISCHER)

que las tiras de gelatina de los frascos con líquido han aumentado notablemente de tamaño, pero el máximum corresponde al del agua acidulada con ClH en la que ph = 1,3 hasta 1,6, en la solución del tubo, pues la que imbibe la tira posee una acidez diferente ph = 3,2, según LOEB. Esta extraña anomalía opuesta a las leyes de la ósmosis ordinaria, la explicamos antes al hablar del equilibrio de DONNAN. Es claro que para que se verifique este fenómeno es necesario aceptar ciertas relaciones físico-químicas entre el líquido que imbibe y la substancia que se hincha, relaciones hasta hoy muy poco conocidas. Así, la gelatina se hincha en agua y no en benzol, el caucho vulcanizado se comporta al revés.

(1) Ver también en el capítulo VII la teoría de LOEB sobre este fenómeno.

A veces se requiere cierta temperatura para que comience el fenómeno, y para apreciarla con exactitud basta seguir la marcha de la viscosidad de una suspensión de la substancia a investigar, así, por ejemplo, para el almidón el hinchamiento comienza a la temperatura en que se aprecia un repentino aumento en el valor de la viscosidad. Algunas substancias, como los cristales de albúmina, presentan interesantes fenómenos de hinchamiento, preferencia en ciertas direcciones, etc., Ciertas sales inorgánicas y hasta metales, como el sodio, potasio, etc., en presencia de amoníaco disuelto o gaseoso, se hinchan conservando su forma externa, y si se consigue después expulsar el NH_3 vuelven a su primitivo estado, fenómeno, como se ve, muy parecido al de que tratamos; pero si el NH_3 actúa largo rato se convierten aquéllos en una masa viscosa y, por fin, pasan la mayoría de las veces al estado coloidal. Lo mismo sucede con la gelatina, caucho, etc., si sobre ellas actúa mucho tiempo y sobre todo a elevada temperatura el líquido que las hincha pasando al fin a soluciones coloidales. La goma arábiga presenta alrededor de 0° fenómenos de hinchamiento típicos con el agua, y a la temperatura ordinaria forma una solución coloidal. La velocidad y la presión ejercida en este fenómeno tienen enorme interés en biología y hasta en mecánica. La dehiscencia de los sacos polínicos y de muchos frutos secos, se explica en botánica por el desigual hinchamiento por imbibición de la humedad, en las dos caras de las paredes que cierra aquellas cavidades, al aumentar de tamaño una más que otra, no tiene más remedio que curvarse la pared, abriéndose por los puntos o líneas más débiles. Los antiguos hacían saltar rocas, introduciendo en sus resquebrajaduras cuñas de madera que luego humedecían. En antropología es sabido que para separar los huesos del cráneo uno de los medios consiste en rellenarlos de una semilla, guisantes, etc., y luego introducirlos en el agua. Los tallos de laminaria utilizados en medicina para dilatar el cuello del útero, los higrómetros de cabello, etc., son otros tantos ejemplos de las aplicaciones de esta propiedad, de las que luego hablaremos con más detenimiento. Existen substancias que favorecen la imbibición y otras que la frenan, tanto entre los electrólitos como entre los no electrólitos. Los agentes más activos para el caso del agua como líquido imbibidor son ácidos y álcalis. Ciertas concentraciones de estas substancias hacen que la gelatina o la fibrina absorban una cantidad de agua mucho mayor que sin ellas, los cianuros, cloruros, yoduros, etc., coadyuvan también al hinchamiento, los sulfatos, citratos, fosfatos, alcohol, azúcar, lo frenan. Respecto a otros albuminoides, hablaremos más despacio en el capítulo dedicado a su química coloidal, de la serie liófila de HOFFMEISTER, y de sus variaciones según la reacción del medio.

Para OSTWALD, la variación interna que se verifica durante el hinchamiento es el proceso inverso al que hemos indicado en la synéresis, como lo indica el hecho de que las gelatinas en synéresis, a la temperatura ordinaria, al ser calentadas se hinchan, adsorbiendo el líquido

que segregaron. Este proceso comienza por la disolución de parte de la gelatina en el medio imbibidor, poco a poco va desapareciendo la gran diferencia de concentración que existía entre los dos sistemas que se forman al producirse el fenómeno de la synéresis y, por fin, de *estos dos sistemas se forma uno solo* con un solo medio dispersante y otro disperso.

En muchos casos la aptitud de un sólido para gelatinizarse por medio del hinchamiento se manifiesta por la posesión de una estructura microscópica particular en él. Butschli y Quincke han demostrado la frecuencia de tales discontinuidades macro y microscópicas, en forma de redes, ondulaciones, celdillas, etc., en las substancias orgánicas, no siendo tampoco raras tales estructuras en los minerales y hasta en los metales. Si fuese cierto, como tales autores piensan, que tales estructuras son la condición previa para que sea posible el hinchamiento de los sólidos, este proceso no sería sino un aumento en el grado de dispersión de ellos, como la synéresis es el opuesto. Para ellos las estructuras groseras de los sólidos, se transformarían al hincharse en otras más pequeñas por separación de las partículas de aquéllas. Gaidukow ha encontrado que las partículas ultramicroscópicas de una gelatina se hacen más pequeñas al hincharse, o por lo menos luminosamente más débiles. Al mismo tiempo cada partícula se solvatiza de por sí, es decir, toma el medio imbibidor, con lo cual aumenta secundariamente su perímetro y poco a poco pasaría al estado líquido.

Por lo tanto, al hincharse por imbibición un coloide sólido debe haber **dos modificaciones esenciales**: *una que consiste en el aumento de su grado de dispersión, y otra que consiste en una variación en el estado de las partículas mismas con tendencia de paso de sólido hacia líquido y ambos procesos, sólo que en sentido inverso deben realizarse en el fenómeno de la synéresis.* Siendo esto lo más general que hoy parece admitirse en ambos procesos estudiados desde el punto de vista de la química de los sistemas dispersos. En la gelatinización, es claro que se recorren todos los grados de tránsito del estado líquido a sólido, habiendo momentos en que adquieren los cuerpos, simultáneamente, las características de los estados sólido y líquido; como los primeros se dejan cortar, doblar, etc., como los segundos al cabo del tiempo se adaptan a la forma de la vasija que los contienen, son algo flúidos, y todos conocemos estados gelatinosos difíciles de definir como líquido o sólido. En tales gelatinas, se difunden fácilmente las partículas moleculares dispersas de una disolución situada en contacto de ella, lo cual las acerca a los líquidos.

Acabamos de decir que las gelatinas poseen una dispersión menor que la de las soluciones coloidales que por enfriamiento las engendran y que, en cambio, su dispersión es mayor que la de los sólidos que las originan por imbibición. Sus partículas deben, pues, poseer un tamaño comprendido entre ambos extremos, y naturalmente, en una gelatina misma, según su estado, podrá variar su dispersión entre la grosera y

la coloidal. Se pueden, por lo tanto, encontrar gelatinas de diferentes grados de dispersión y aun, según las investigaciones de Zsigmondy y Bachmann, existen muchas en las que simultáneamente se presentan estructuras diferentes, se encuentran partículas coloidales y al mismo tiempo otras que reuniéndose entre sí originan partículas ya microscópicas. Esto es lo más probable además, si se considera la gelatinización como una continuada separación de una solución coloidal en sus dos componentes. La observación ultramicroscópica se dificulta por la circunstancia de la poca diferencia de refringencia de sus constituyentes, pero se puede aceptar que las gelatinas procedentes de soluciones coloidales enfriadas, según el tamaño de estas partículas coloidales primarias poseerán un grado de dispersión, situado bien en el límite superior del estado coloidal o ya en el francamente microscópico, pero aun en este último caso, según los dos autores citados, se podría demostrar con el ultramicroscopio la existencia de partículas coloidales.

No sólo el grado de dispersión y el agua de imbibición, sino el *modo de ser* de los elementos estructurales de la gelatina pueden variar. Las originadas por hinchamiento no presentan partículas cristalinas, todas ellas, como muchas de las otras, son *gelatinas emulsoides*. Pero algunas de las originadas al cuajarse por enfriamiento soluciones coloidales, presentan en seguida o al cabo del tiempo estructura cristalina, como saben los químicos que sucede con las gelatinas de los hidróxidos metálicos o como las del ácido silícico que con el tiempo se cristalizan. Pasan de ser elásticas a ser quebradizas, de *emulsoides* a *suspensoides gelatinas;* tal paso del estado amorfo al cristalino ha sido atestiguado por el estudio mediante los rayos Röntgen hecho, como se indica en el capítulo II, por el método de Scherre y Debye, estudio que denuncia una estructura amorfa en las primeras, y cristalinas en las segundas. (Actualmente va extendiéndose la idea de la cristalinidad de casi todos los coloides, aun de muchos que se consideraban como amorfos.) Las gelatinas emulsoides son más elásticas que las suspensoides, aunque éstas puedan adquirir un grado grande de elasticidad por la formación de maclas y otros medios de fijación de los elementos cristalinos (fig. 37).

Para acabar, vamos a llamar la atención sobre un fenómeno interesante que aparece con claridad cuando se comparan estos dos procesos inversos «hinchamiento por imbibición» y «desecación» de un hidrogel, cuya representación gráfica aparece en la figura 37 en que las dos curvas inversas nos delatan la existencia de un caso típico de *Hystéresis* (1). Es necesario advertir que la desecación se desarrolla muy diferentemente según el modo de preparación y la vejez del hidrogel. La manera más corriente de realizarse es como indica la figura 37 (curva $D_\beta, D_{a\beta}, D_a$). La tensión del vapor disminuye como se

(1) Algunos llaman *Hystéresis* sencillamente a las variaciones que las soluciones o los precipitados coloidales sufren espontáneamente en el transcurso de largo tiempo que son, pues, signos de vejez de los coloides.

ve a lo largo de D_β, al mismo tiempo que el volumen del hidrogel se hace menor en la medida de la pérdida de agua. En el punto O (cambio) se acoda la curva y a lo largo de OO_1 se aprecia que la pérdida de agua es grande, a pesar de permanecer la presión casi constante y de no variar apenas el volumen del ácido silícico. Al mismo tiempo el hidrogel se enturbia, toma el aspecto de porcelana y luego vuelve a aclararse hasta hacerse del todo transparente en el punto O_1. La desecación más avanzada requiere el concurso de elevadas temperaturas y tiene lugar como lo indica el trozo D_α. Es notable que la desecación en el trozo D_β es del todo irreversible, pues si en el punto O

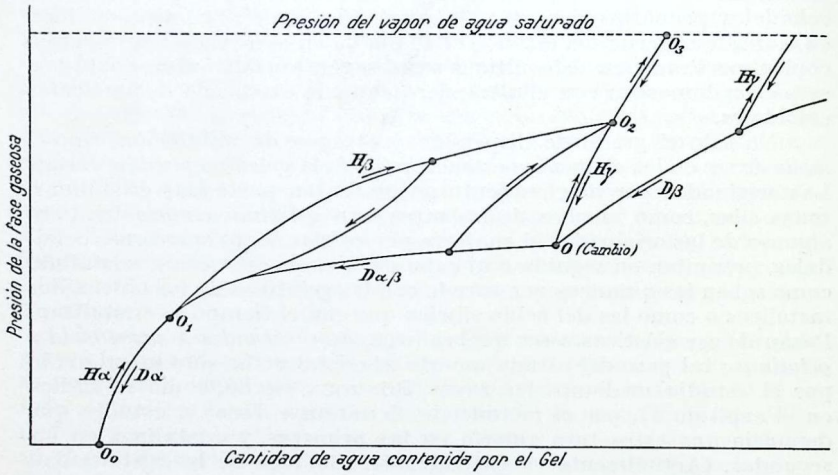


FIG. 37. Curva esquemática del « Quellung » y de la pérdida de agua de un hidrogel de ácido silícico sometido a variaciones progresivas de tensión del vapor acuoso (según van BEMMELEN)

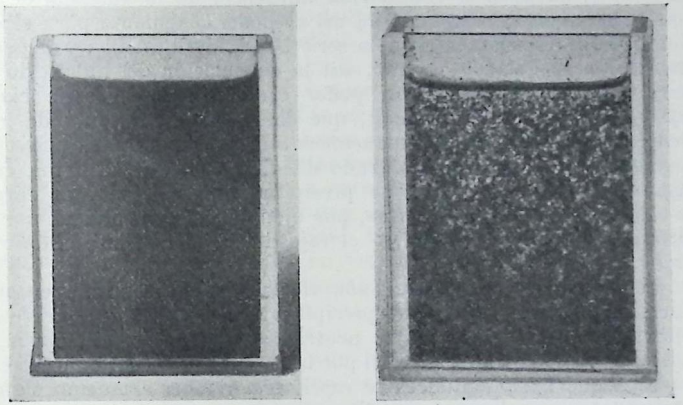
volvemos a devolver agua al hidrogel (quellung) éste se verifica según una curva diferente H_γ. El trozo O_0O_1 representa una fase reversible del fenómeno de la desecación, pues la curva del fenómeno inverso (imbibición) H_α coincide exactamente con la de la primera. Y es muy característico el trozo de curva OO_1. Todos los puntos de él pueden ser alcanzados por apropiada hidratación y por la correspondiente desecación subsiguiente, pero por diferente camino. A partir de O_1 la curva de la imbibición sube con respecto de la otra, el hidrogel parece que ofrece resistencia a adquirir el agua. Así de O_0 a O_2 al hincharse el ácido recorre la curva H_α H_β y al desecarse, por el contrario, sigue la H_γ, $D_{\alpha\beta}$ y D_α, es decir, que en el trozo OO_1 se separan las curvas correspondientes al fenómeno del « Quellung » y al de la « desecación » *Hystéresis*. Esta relación varía con la vejez del coloide

y en los seres vivientes con la del protoplasma, lo cual tiene gran importancia sobre todo en el estudio de los fermentos.

Otra variación muy importante del estado coloidal en su grado de dispersión conduce a la

Coagulación (fig. 38)

que consiste en una disminución del grado de dispersión de una disolución coloidal conducente a sistemas dispersos macro y microscópicos. Este proceso ha despertado siempre el interés de los



a *b*

FIG. 38. Coagulación de una suspensión acuosa de negro de humo *a*, no coagulada; *b*, coagulada por adición de SO_4H_2 al 2 % (según FREE)

químicos de coloides y se ha tratado siempre de explicar, por las diferentes teorías coloidales como uno de los procesos dignos de mayor atención. Siendo un fenómeno debido a una variación en el grado de dispersión, podrá ser provocado por todas las causas de que hablamos en el capítulo I como capaces de originar una modificación en la dispersión del coloide disuelto. Y todos los métodos allí indicados para la obtención de coloides podrán utilizarse aquí sólo en sentido inverso, ya que la coagulación es siempre un proceso de destrucción del estado coloidal. Los suspensoides se diferencian desde este punto de vista notablemente de los emulsoides, como veremos en seguida al indicar métodos y causas de la coagulación.

Coagulación por electrólitos. Los electrólitos coagulan con gran facilidad, sobre todo los *suspensoides*, y en este caso se debe tratar de

una *coagulación eléctrica*, sobre todo, aunque no tan exclusivamente como hasta aquí se pensaba. La precipitación de los suspensoides se produce por partículas dispersas cargadas de electricidad de signo contrario a la del coloide disuelto. Así los metales coloidales son precipitados por ácidos en concentraciones pequeñísimas, es decir, aquellos cargados negativamente son influidos por iones H. que son positivos, también se muestran en estos casos muy activos los cationes de las sales neutras. Por el contrario, el hidróxido de hierro coloidal cargado positivamente es precipitado con más facilidad por las bases, es decir, por el ion OH negativo y también por lo aniones de las sales neutras. La influencia eléctrica en la coagulación electrolítica se advierte, además, al estudiar la influencia de la valencia de los iones como agentes coagulantes ; así el poder coagulante para el oro coloidal sube rápidamente en la serie NaCl, $MgCl_2$, $AlCl_3$; y respecto a los aniones ocurre lo mismo, así la coagulación del hidróxido de hierro que es provocada con poder creciente por la serie NaCl, Na_2SO_4, $Na_3(C_6H_5O_7)$. Es decir, que de las sales con iones de *más valencias*, se necesitan concentraciones *mucho menores* para provocar esta radical disminución del grado de dispersión que se llama coagulación. Del mismo modo se precipitan entre sí coloides cargados de diferente signo eléctrico, por ejemplo, el oro coloidal por el hidróxido de hierro coloidal, o el rojo de congo y el hidróxido alumínico.

La causa de esta coagulación eléctrica, debe consistir en una atracción de las partículas del precipitante por las del que va a precipitarse, al juntarse ambas se neutralizan en su carga eléctrica, y en seguida éstas se unen entre sí por la natural atracción de unas con otras, ya que hasta entonces se repelían por tener el mismo signo ; aunque debemos advertir que el precipitado o coágulo mismo puede poseer una carga eléctrica. Bastan pequeñísimas concentraciones de electrólitos para precipitar los suspensoides ; así, se sabe que no se debe diluir la tinta china con agua ordinaria, pues basta la pequeñísima concentración salina de ésta para precipitar aquélla.

La coagulación electrolítica de los emulsoides es ya mucho más complicada. La precipitación por medio de sales neutras de una disolución de albuminoides, por ejemplo, comprende dos procesos muy claros. En el primero se verifica una deshidratación de las micelas que producirá una disminución de su tamaño y, por lo tanto, un aparente aumento en el grado de dispersión, y después, o al mismo tiempo, se realiza el segundo proceso cual es la unión de ellas en agregados mayores. El papel de la deshidratación se advierte por la circunstancia de necesitarse, en general, cantidades grandes de sales para verificar tales precipitaciones, y por eso se considera a los emulsoides hidratados como mucho más estables que los suspensoides cuya sensibilidad respecto a los electrólitos es, como hemos visto, muy grande. Esto tiene gran interés para nosotros porque los fermentos y en general los coloides orgánicos son emulsoides hidratados.

La fase de deshidratación de tales coloides, realizada bien sea por las sales neutras o por el alcohol, etc., no es de naturaleza eléctrica, aunque indudablemente esta fuerza puede influir, sino que posee sus leyes propias físico-químicas hoy por hoy no bien conocidas. Así, que en la precipitación de los emulsoides hidratados, por la acción de sales neutras, deben verificarse procesos eléctricos y no eléctricos, ya que según W. Pauli, en ciertos casos precipitan con distinta finalidad en la coagulación los dos iones de la sal coagulante, resultando ambas acciones a veces de efectos aditivos y otras antagonistas.

Todo esto vale para emulsoides débilmente cargados o neutros eléctricamente, mientras que en los que poseen marcado carácter eléctrico, como los albuminoides coloidales ácidos o básicos, vuelven a aparecer como en los suspensoides, las causas eléctricas, como las más importantes en la precipitación. Para la coagulación de soluciones albuminoides acidificadas, es decir, positivas, crece el poder coagulante de las sales neutras, en la serie iónica llamada de Hoffmeister, tan citadas en todos los tratados de química fisiológica, por observarse la misma serie en diferentes fenómenos como poder imbibidor de las soluciones, etc., tal serie es para los aniones : cloratos, nitratos, cloruros, acetato, sulfatos, tartratos, etc., y para los cationes : magnesio, amonio, sodio, potasio, litio. Esta serie debe invertirse si se trabaja con soluciones básicas en vez de ácidas. Se ve que aquí la cuestión de las valencias de los iones pierde por completo por su valor (lo contrario que decíamos para los suspensoides). En cuanto a las soluciones neutras, según W. Pauli no pierden en modo alguno la facultad de ser precipitadas por sales neutras. Repitamos para acabar, en vista de todos estos hechos, que las causas eléctricas en estos casos, juegan sólo un papel secundario y que esta coagulación es posible que fuese mejor llamarla **coagulación por sustracción del disolvente.**

Si estudiamos los fenómenos de coagulación en mezclas de suspensoides y de emulsoides, veremos que éstos comunican su estabilidad, aquéllos haciéndose los suspensoides mucho menos sensibles a los electrólitos, adición de sales, etc. Este fenómeno se denomina «acción de protección» *(Schutzwirkung)*, y su explicación está en que las gotitas líquidas, que constituyen el emulsoide, engloban, rodeando las partículas del suspensoide o por lo menos se unen con ellas, lo cual es confirmado por la observación ultramicroscópica. Pequeñas cantidades de emulsoides bastan para realizar tal acción protectora, lo cual está conforme con la explicación dada ya que cada partícula del emulsoide puede proteger otra del suspensoide. Se aplica a menudo en la industria y con fines científicos tal acción ; así, en presencia de poca gelatina se pueden preparar soluciones de suspensoides, mucho más concentradas y mucho más dispersas que en los medios dispersantes puros. La acción del tanino aprovechada en la obtención del oro rojo coloidal, que citamos en el capítulo I, es debida a su acción protectora. Otra aplicación de esta acción protectora ha sido la obten-

ción por su medio de un residuo seco evaporando soluciones de suspensoides, cuyo residuo debido a la solubilidad del emulsoide protector, puede fácilmente ser nuevamente disuelto con lo que se obtienen en seguida soluciones coloidales del mismo grado de dispersión que la primitiva. Estos *hidrosoles sólidos*, obtenidos según las prescripciones de PAAL utilizando como protectores productos de descomposición de los albuminoides, son fácilmente manejables y transportables y se usan ya en la práctica, se trata de escamas, trocitos obscuros, etc., que se disuelven pronto en el agua y originan en seguida una solución coloidal, sea de plata, de oro, etc.

Para investigar el grado de poder protector de un emulsoide se utiliza lo que suele llamarse *índice de oro*, basado en la mayor o menor cantidad de un electrólito que hay que añadir a una solución tipo de oro coloidal para coagularla según la especie y cantidad del protector.

Otras coagulaciones. Existen otros procesos coagulatorios provocados sin adición de substancia alguna, sólo por la acción del radio, por la de la iluminación adecuada, por agitación con diferentes polvos (carbón, arcilla de batanar, etc.) o con otros líquidos no miscibles, etc. Así, muchos coloides como la albúmina se pueden separar de su medio dispersante, provocando en ellos una disminución de la dispersión, sin más que agitarlos con benzol, petróleo, petroleter, durante algún tiempo. Los químicos saben que muchos productos orgánicos cristalizan, al fin, frotándolos largo tiempo en un matraz con estas substancias. Sólo el batir la albúmina para hacerla espumosa basta para provocar la coagulación de parte de las partículas existentes en los tabiques alveolares de la espuma. Por centrifugación intensa se puede disminuir la dispersión coloidal llegando a la coagulación. *Estos serán métodos mecánicos de coagulación.* Vamos a pasar al proceso contrario a la coagulación, o sea a la

Peptización

que consiste en un aumento de dispersión, o sea disminución del tamaño de las partículas groseras. Los mismos agentes mecánicos, eléctricos, químicos, etc., provocadores de aquélla pueden producir la peptización. Así, ciertos geles tratados por bases o ácidos débiles pueden ser nuevamente llevados al estado coloidal, otros por la acción de pequeñas cantidades de electrólitos. Así, ciertos sulfuros recién precipitados basta tratarlos por el SH_2 diluído, para que pasen nuevamente al estado coloidal. Un gel de yoduro de plata en agua y recién precipitado, se puede transformar en solución por medio del yoduro potásico en ciertas proporciones (0,03 normal), por debajo o por encima de la cual sigue el yoduro de plata al estado de gel (dispersión grosera). No son raras estas propiedades dispersantes de muchos electrólitos en concentraciones débiles, en las que sabemos

que se forman iones productores o estabilizadores de soluciones coloidales. Pero es notable que su acción se ejerza sólo cuando el gel está recién formado y posee cierto modo de ser mecánico. Quizá dependa tal condición de que en los geles recientes las micelas o partículas coloidales están todavía sólo aglutinadas pero no fundidas entre sí. Los iones citados comunicarían a las partículas coloidales primarias del gel cierta carga eléctrica que conduciría a su repulsión mutua o sea a su disolución bajo forma coloidal. Vemos, por consiguiente que tanto en los emulsoides como en los suspensoides existen coagulaciones capaces de ser reintegradas al estado coloidal. Son **coagulaciones reversibles,** que en general son más frecuentes en los emulsoides que en los suspensoides. Pero es un error que aparece a veces en la literatura al considerar la irreversibilidad de la precipitación como una característica de los suspensoides.

Aplicaciones biológicas de estos hechos

Procesos de la índole indicada se realizan constantemente en los seres vivos, y estructuras y estados semejantes a los descritos al hablar de los procesos de gelatinización, coagulación, etc., también. La abundancia de albuminoides, lipoides y tantos otros coloides en los organismos hacen comprender fácilmente este aserto. Sobre tales compuestos como coloides trataremos en un capítulo aparte; ahora citaremos algunos hechos biológicos que tienden a aclararse basándose en el conocimiento de estos fenómenos coloidales. Uno muy interesante es el referente a la **constitución de protoplasma.** Todos hemos oído hablar de las teorías, filar, reticular, granular, alveolar, etc., del protoplasma. Sin que se pueda pretender explicar totalmente estas estructuras por sus imitaciones en los laboratorios, diremos que tiene mucha importancia que se hayan conseguido obtener artificialmente estados muy parecidos valiéndose sólo de variaciones en soluciones coloidales. Así, M. BEIJERINCK, mezclando soluciones de gelatina y de almidón en diferentes concentraciones, ha visto que en muchos casos no formaba la mezcla un hidrosol con partículas coloidales más o menos dispersas, sino que se formaban gotitas, redes, alvéolos, etc., como en el protoplasma. La imitación de estas formas y de procesos biológicos como las referentes a división celular, figuras cario-quinéticas (fig. 39), movimientos amiboides, gastrulación y tantos otros por medio de coloides, se ha llevado en muchos casos a grados de perfección asombrosos (fig. 40), sin que, como decíamos, se pueda segurar la identidad de procesos realizados con la materia muerta y los de los seres vivos [1]. Sin embargo, OSTWALD dice, que esto que llamamos nosotros imitaciones, son experimentos de verdadera síntesis biofísica y que tienen la

[1] El lector que desee enterarse de estos intentos puede consultar la obra *Methodik der Nachahmung von Lebens vorgängen durch physikalische konstellationen*, de R. KUMBLER y HAMS MÜNDEN, en el cuaderno 2.°, parte 3.ª, capítulo V del *Handb. der biol. arb. metk*, de E. ABDERHALDEN.

misma significación que tuvo para la bioquímica, la síntesis de la urea por WOHLER, o la del descubrimiento de la catálisis por metales coloidales para la bioquímica sintética. El cree que el problema de la síntesis de un ser viviente es un problema perfectamente científico para el que la química coloidal ha de aportar enorme ayuda a la física y a la bioquímica. Se ha discutido mucho sobre si el protoplasma es sólido o líquido, y en realidad no es ni lo uno ni lo otro o es los dos. Tiene las propiedades físicas de un emulsoide hidratado con todos los estados posibles de viscosidad entre la de un líquido normal capaz de resolverse en gotitas y la de una gelatina cuajada con las propiedades de un sólido, como decíamos que sucedía a una solución de gelatina según su concentración y su temperatura. La existencia de corrientes protoplasmáticas, la formación en su seno de vacuolas circulares, los pseudópodos, el hecho de que trocitos de protoplasma separados adopten la forma de gotitas, y presenten fenómenos capilares, etc., corresponde a propiedades de un líquido. Pero por otra parte, las células poseen cierta plasticidad, cierta tendencia a conservar su forma, así una amiba deformada por la presión adquiere al cabo de algún tiempo, aunque éste sea largo, su forma más o menos redondeada. Las células procedentes de la división del huevo de la rana, modificadas igualmente por presiones, estiramientos débiles, etc., conservan estas formas alteradas algunas horas. Como veremos en seguida, la cantidad de agua que imbibe las diferentes partes de una célula, varía de un momento a otro notablemente, originándose con estos cambios las modificaciones correspondientes en la estructura celular en cortos espacios de tiempo. L. RHUMBLER ha trabajado mucho en esta cuestión, y para él la estructura espumoide del protoplasma sería la que mejor explica sus propiedades físicas; pero más modernamente el

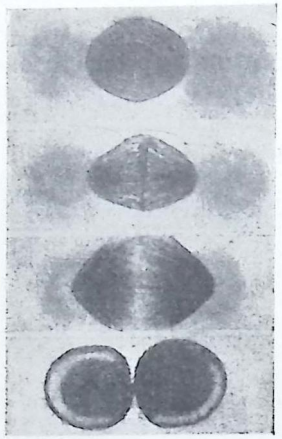


FIG. 39

Cuatro estadios sucesivos de imitación de la cariokinésis, obtenidas colocando una gota de solución isotónica de sal común coloreada con tinta china entre otras dos gotas hipertónicas e igualmente coloreadas, según LEDUC (1912)

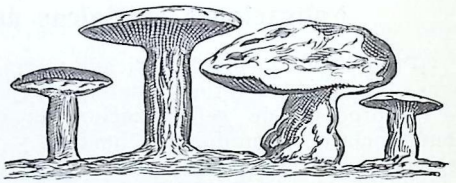


FIG. 40. Formaciones imitando hongos, obtenidas por LEDUC (1912)
echando en un recipiente soluciones de sales muy concentradas, sobre ellas con sumo cuidado otras de tanino o ácido silícico y por fin agua destilada. LEDUC, *Das Leben in seinem phisikalisch-chemischen Zusammenhang*. Halle Hofstester 168 (1912)

profesor de Heidelberg, discípulo de O. BUTSCHLI, J. SPEK combate tal idea. Este ha realizado sus investigaciones mediante la observación directa del protoplasma vivo con el ultramicroscopio y sometiendo paramecium, amoebas, etc., a la acción de diferentes sales, dice que en realidad el protoplasma de muchas células es una emulsión con una parte dispersante y homogénea, que es el hialoplasma, y otra dispersa mucho más acuosa que en forma de finas gotitas está incluída en aquélla. Por la acción de ciertas sales, de las series liófilas o liófobas, antes citadas, logra hacer que se aumente o disminuya el tamaño de las gotas acuosas, las cuales a veces se hacen tan grandes que dan al protoplasma el aspecto completo de una espuma, como lo creía RHUMBLER. Para SPEK el problema actual está en averiguar ahora la ultraestructura del hidroplasma, es decir, que con el ultramicroscopio no se ha resuelto el problema de la estructura protoplasmática, sino que ha ocurrido aquí lo que en tantos otros problemas científicos: resuelto un enigma ha aparecido el mismo un poco más lejos.

Fecundación del huevo

Desde que J. LOEB descubrió con los huevos del erizo de mar la partogénesis artificial, es decir, la facultad de provocar el comienzo de la división del huevo mediante medios físico-químicos y sin necesidad de fecundización, tratándolos con ciertas concentraciones de ácidos, bases o sales, y posteriormente y por otros investigadores, mediante variaciones de temperatura, acción de líquidos orgánicos, sueros, medios mecánicos, etc., se vió que el espermatozoide no jugaba ninguna acción vital, sino que su función en este aspecto era puramente físico-química, prescindiendo de su papel transmisor de los caracteres hereditarios paternos (1). Para OSTWALD todos estos métodos tienen de común el que provocan variaciones en los coloides celulares especialmente coagulándolos, pues, en efecto, todos estos agentes obran como coagulantes de soluciones de albúmina en el tubo de ensayo. Sabido es que la división celular cario-quinética va acompañada de la producción de astrosferas procedentes del centrosoma y que de aquéllas parten los filamentos acromáticos que se reúnen en forma de husos característicos; pues bien, se ha logrado en mezclas coloidales provocando procesos parciales de coagulación, producir estructuras asombrosamente parecidas a las naturales.

La observación microscópica de estas astrosferas y los ensayos de merotomía celular, que han permitido, aislándolos, estudiarlos más detenidamente, permiten considerarlos como colecciones de protoplasma de relativa consistencia y de menor cantidad de agua que el resto, es decir, que aparecen como verdaderas coagulaciones limitadas; es un proceso de paso de sol a gel. Claro es que tal coagulación no es

(1) Véase en el capítulo sobre lipoides, la influencia en este fenómeno de los agentes citolíticos.

el proceso total de la división celular ; parece, sin embargo, que tiene gran importancia como punto de partida de la división.

Debemos añadir que se ha comprobado por diversos autores, el hecho de que a medida que el hombre y los animales envejecen, se aprecian una variación de dispersión en diferentes coloides vitales, en el sentido de disminuir aquélla con la edad. Tal fenómeno es un síntoma como tantos otros de la vejez, pero no su causa, como se ha pretendido por algunos.

Importancia del hinchamiento por imbibición en Biología y Medicina

Existen muchos fenómenos en los que como variable la más importante aparece ella. El proceso de la gastrulación se puede explicar, según el autor antes citado, J. Spek, suponiendo la existencia de una imbibición celular desigual en diferentes regiones de la blástula que origina el repliegue de alguna de ellas. Las anomalías de

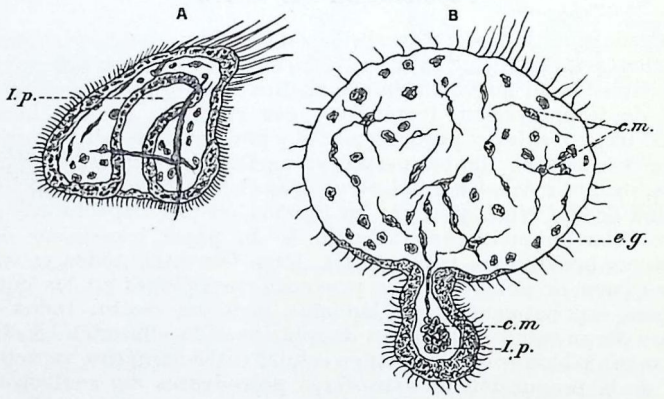


Fig. 41

A, Gástrula normal de *Echinus microtuberculatus* ; *B*, Gástrula de *Sphaerechinus granularis* criada en agua de mar a la que se añadió algo de cloruro de litio (según Herbst) ; *I.p.*, intestino primitivo (normal en *A* evaginado en *B*, *exogastrula*) ; *e.g.*, ectodermo gastrular ; *c.m.*, células mesenquimatosas. (Im. de Herbst).

este proceso, entre las que merecen citarse las gástrulas de equinodermos obtenidas por C. Herbst (fig. 41), que forman el endodermo hacia afuera en vez de incluído en el ectodermo, y que fueron obtenidas mediante la acción de ciertas concentraciones de sales de litio sobre los huevos en división, han sido explicadas por Spek considerando siempre como factor más variable el hinchamiento por imbibición.

El rápido crecimiento y aumento de peso de las plantas jóvenes y de ciertos animales en sus primeros estados, como los renacuajos y otros animales acuáticos ; es debido en su tanto por ciento más grande a las enormes cantidades de agua que absorben para formar sus tejidos, que llega a veces a ser el 93 % del peso total. Tal acumulación de agua es explicable por la existencia en sus jugos de iones que favorecen la imbibición, así en el caso de las plantas jóvenes se sabe que contienen jugos ácidos y ya sabemos que los H. iones, favorecen mucho la hidrofilia de los tejidos aun en pequeñas concentraciones.

En la contracción muscular debe jugar la imbibición desigual de sus elementos un papel muy importante, y sabemos que allí hay alternancias en la producción de ácidos, lo que explica la variación de sus diferentes elementos en el contenido en agua. Para Ostwald, los **fenómenos secretorios** en que se observa expulsión de líquidos por las células y tejidos glandulares en contra, a veces, de las leyes osmóticas e hidrostáticas, *podría similarse al fenómeno de la synéresis.* Como sucede en la synéresis de la gelatina en la que el líquido segregado es una disolución diluída de los coloides y sales que contiene aquélla, aun cuando en proporciones diferentes. También en la orina, por ejemplo, existen sales y substancias procedentes de células y tejidos a veces no dializables, como sucede con el nitrógeno llamado coloidal. No se conocen las fuerzas que regulan los cambios íntimos de la synéresis, y por lo tanto tampoco los secretorios ; pero esta analogía servirá para indicar que en la química coloidal aparece un fenómeno explicable con seguridad por fuerzas físico-químicas hoy desconocidas, muy semejante al secretorio, en el cual último por faltar otras explicaciones, como de ósmosis, presión hidrostática, etc., parece que habría que invocar sino la acción de alguna fuerza vital.

Los procesos de fijación histológicos y muchos de coloración, son fenómenos en que los agentes actúan en seguida sobre los coloides celulares, y seguramente se beneficiarán grandemente del adelanto de la química coloidal. Para los colores vitales se ha visto ya que su grado de dispersidad juega un papel muy importante en relación con su penetrabilidad en la célula.

El problema de la permeabilidad de la membrana y del protoplasma que tanta importancia tiene en los fenómenos normales y patológicos de la nutrición de los tejidos y en terapéutica, se está atacando hoy con esta orientación francamente coloidal, y ya diremos algunas teorías sobre ello en el capítulo sobre Lipodes.

La cuestión de los edemas y de la nefritis desde este punto de vista. Es natural que en Patología se haya tratado de apelar a la química coloidal para tratar de explicar ciertos procesos caracterizados por acumulaciones en los tejidos de grandes cantidades de líquido. Nos referimos, especialmente, a los *edemas*, sea cualquiera su origen incluyendo aquí los que acompañan a ciertas *nefritis*. El investigador americano M. H. Fischer ha sido indudablemente el principal pro-

motor de esta orientación patogénica que aunque tiene muy pocos partidarios merce ser examinada. El ha resumido los resultados obtenidos por él y su escuela en dos obras, *Das Aedem* y *Die Nephritis* (1911 y 1913), Dresden y Leipzig.

La causa, según esta teoría, de tales anómalas acumulaciones de líquido acuoso está en la variación pudiéramos decir patológica de la aptitud de los coloides contenidos en los tejidos para retener el agua, es decir, en su facultad de imbibición *(quellung)*, apareciendo como principal promotor de tal anormal imbibición, sobre todo *los ácidos*, a cuya formación hace responsable FISCHER, principalmente, del edema. Los ácidos pueden aumentar en todos los procesos en que las oxidaciones normales se hallan alteradas, como en ciertos envenenamientos, en dificultades circulatorias, sea cualquiera su origen anatómico, patológico, experimental, etc., El hinchamiento producido por la picadura de una abeja es debido sólo al ácido fórmico allí introducido por ella, y artificialmente se puede reproducir inyectando en una placa de gelatina el ácido y dejando tiempo para que se hinche. Del mismo modo tejidos y órganos enteros, pierna de una rana, el ojo de un carnero, etc., colocados en soluciones en que haya electrólitos, favorecedores de la imbibición de aquéllos se hinchan notablemente al cabo de algunas horas. Los ácidos provocan, los que más, la imbibición, al paso que el sulfato de magnesio la arruga. La sensación táctil producida por tales órganos hinchados es semejante a la del edema, y así como en el caso de la placa de gelatina se puede provocar el deshinchamiento mediante la inyección de sales opuestas a su imbibición, se utilizó como medio terapéutico, la inyección en los edemas de semejantes substancias. Es claro que el edema consiste también en acumulaciones acuosas no en los mismos tejidos, sino en intersticios de éstos, pero, según OSTWALD, el fenómeno de la Synéresis explicaría perfectamente esta expulsión de agua, verificada por los coloides de los tejidos sobresaturados de líquido. Se ha objetado que la acidez o sea la concentración de iones H de los tejidos en estado edematoso es, a veces, menor que la normal, pero es que hay que distinguir la acidez libre que se aprecia por los medios ordinarios, y la no libre que escapa en general a estos métodos. Hay que tener en cuenta la *acidez actual* y *la potencial*, que reunidas dan *la total*, cuyo valor es el que verdaderamente importa para el edema.

En la patogenia del glaucoma en el que al lado de la hinchazón del globo del ojo, hay enturbiamiento de la córnea, etc., debe intervenir, además de la imbibición total, fenómenos de coagulación que producirían aquellas opacidades.

Los patólogos han opuesto serias objeciones a esta teoría que parecen bien resumidas por F. VOLHARD (1). En síntesis, dice lo siguiente : El experimento fundamental de FISCHER fué éste ; ligaba el muslo de una rana por encima de la rodilla y metía luego el animal

(1) *Tratado de medicina interna*, de L. MOHR y STAEHELIN, tomo XII, página 123. — *Enfermedad de Bright*, por F. VOLHARD.

en agua destilada, en estas condiciones la pata se edematizaba (fig. 42). FISCHER suponía que la causa del edema era la producción de un ácido en la pata ligada, cuyo ácido favorecía su hinchamiento, y tal ácido lo atribuía él al defecto de oxígeno que se hace sentir en el citado miembro por dificultad circulatoria. VOLHARD lo rebate con la siguiente prueba; dice : prívese de sangre la pata de la rana por ligadura aislada de la arteria del muslo y se verá que no se produce edema a pesar de que el examen microscópico de la membrana interdigital revela estasis circulatoria. En cambio, si se liga la pata dejando libres la arteria y la vena, el edema se presenta en cuanto se sumerge la rana en el agua, no obstante subsistir la circulación capilar. El mismo resultado da el experimento, si en vez de agua destilada se emplea solución de RINGER inerte por su tensión osmótica. El agua, por lo tanto, en la experiencia de FISCHER no procede de la sangre, sino que la absorbe la piel de su alrededor. Obedece tal absorción a una propiedad particular de la piel de la rana, descubierta por REID, que consiste en que aunque no haya desnivel osmótico absorbe líquidos de fuera, y a través de su masa los impele hacia adentro. Continúa VOLHARD : aun aceptando la hipotética suposición de que en las nefropatías con hidropesias hay hiperacidez de los tejidos, el error fundamental de FISCHER consiste en el concepto del edema que él tiene, pues habla, sobre todo, de *hinchazón de los tejidos*, y en este estado sólo se puede decir que hay edema *intracelular* o, mejor dicho, *preedema*, pues el verdadero edema consiste en la acumulación de líquido *en las mallas* o *intersticios del tejido*. Teniendo esto en cuenta se llega con la teoría de FISCHER a conclusiones contrarias a las suyas, ya que la hidrofilia de las células absorbería el líquido de los intersticios *haciendo desaparecer el verdadero edema*. Hasta el punto de que la introducción de un coloide hidrófilo en el tejido celular subcutáneo de un edematoso o en la cavidad peritoneal de un ascítico absorbería con rapidez el líquido de las mallas del tejido y de la cavidad del peritoneo. VOLHARD cree que si los coloides obran en la producción del edema será disminuyendo su hidrofilia, es decir, su poder de almacenamiento de líquidos, ya que esos sólo aparecerían libres cuando las células y tejidos estuviesen saturados. Unicamente si se demostrase que las membranas de los capilares al aumentar su hidrofilia se hacían más permeables y dejaban pasar más agua que la que las células a pesar de su hidro-



FIG. 42. Rana con la pata derecha ligada y edematizada (según M. H. FISCHER)

filia podían retener, podría aceptarse aunque, como se ve, completamente transformada esta teoría de FISCHER. Pero aun habría que aceptar : *a*) que las células se hacen excesivamente ácidas en el edema; *b*) que son excesivamente hidrófilas, y *c*) que están extraordinariamente hinchadas, y VOLHARD cree encontrar razones para demostrar que no se verifican ninguna de las tres condiciones. Acaba así : « De todo lo expuesto se deduce que la teoría de los edemas de FISCHER no podría encontrar los partidarios que esperaba ni desplazar las ideas anteriores a ella. »

CAPÍTULO VI

Tensión superficial de los líquidos Adsorción

Concepto práctico de la tensión superficial

Se sabe que una gota de un líquido tiene forma esférica, es decir, que una porción pequeña de un líquido abandonada en el seno de un gas adopta la forma de una esfera. Como quiera que la esfera es el cuerpo que a igualdad de espacio ofrece menos superficie, deducimos que los líquidos tienen la tendencia de hacer su superficie lo más pequeña posible. Todo pasa como si la gota estuviese rodeada de una película elástica y en tensión, que como es natural ejercería en cada punto de la misma una presión con tendencia a conseguir el mínimun de superficie. Esta presión representa la *tensión superficial.* Se concibe que exista tal presión, teniendo en cuenta que una molécula situada en el seno de un líquido, se halla atraída por las que le rodean con igual fuerza en todas direcciones, por lo tanto, no tendrá tendencia ninguna a desplazarse ; en cambio, las que están en su superficie sólo son atraídas por las de dentro y las de su lado, su campo de atracción es una semiesfera (es despreciable la atracción que pueden ejercer las moléculas del aire que están próximas, sobre ella) y a estas moléculas tienen, como se ve, una tendencia que en equilibrio está contrarrestada por la propia resistencia del líquido. Así que la tensión superficial resulta de una atracción del centro sobre la periferia.

Si en general se tratase de una gota de un líquido en el seno de otro, aceite en agua, por ejemplo, o de un sólido en un líquido, la atracción hacia afuera del medio envolvente no sería despreciable, y entonces podríamos decir que la tensión superficial resultaría de la diferencia entre la atracción que las partículas de las dos fases ejercen sobre las moléculas situadas en las superficies que limitan ambas, por eso se llama también tensión interfacial (1).

Como hemos dicho que la tendencia del líquido es la de ocupar la menor superficie posible, necesitaremos realizar un trabajo si que-

(1) Por eso variará la tensión superficial de un líquido según la fase con que esté en contacto; así será distinta la del agua respecto al aire, a la del agua respecto al aceite, carbón, etc.

remos aumentarla. Esto se ve claro con el ejemplo siguiente de MAXVELL (fig. 43): Tomamos un marco de alambre en forma de U sea el *A, B, C, D,* que lo cerramos con la varilla *m n* que puede correr por sus argollitas hacia arriba o hacia abajo, lo dejamos en la posición *m n* e introducimos todo en agua jabonosa; todos sabemos que al sacarlo se forma una peliculita *m BCn;* podemos incluso colgar pesos *p* en el platillo que cuelga de *m n*, sin notar nada; al principio, sostendría a los pesos la tensión superficial de la masa líquida *m B C n*, que se opone al aumento de su superficie, pero si el peso es mayor podemos llegar a hacer estirarse a la lámina por bajar *m n* a *m' n'*, por ejemplo, si aumentamos el peso llegaríamos a romperla. Hemos hecho un trabajo para aumentar la superficie, por eso viene muy a menudo definida la tensión superficial diciendo que es *igual al trabajo necesario para aumentar la superficie en una unidad*, o sea que viene dada numéricamente por el trabajo necesario para *crear la unidad de superficie.*

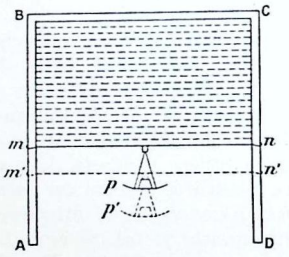


FIG. 43

La energía superficial dependerá de dos factores; de la tensión total de la superficie, y de la energía por unidad de ésta, o sea de la tensión superficial. Esta es, pues, un factor, el factor *intensidad* de *aquélla*, la superficie total del líquido será su factor *capacidad*. Si la energía superficial por cualquier procedimiento se hace libre o sea que por disminuir, por ejemplo, la superficie del líquido aparentemente se pierde, es evidente que se habrá transformado en otra forma de energía, como calor, energía mecánica, etc., y viceversa.

La tensión superficial varía mucho según la naturaleza química de las fases en contacto, aunque no se han podido establecer leyes generales acerca de tal variación. Y es un hecho muy importante que tanto los iones, como las moléculas, como los coloides existentes en un medio de dispersión cualquiera, sea el agua, varían la tensión superficial de ésta a veces notablemente; pero antes de entrar en ello debemos decir dos palabras acerca de los **medios prácticos usuales de medida de la tensión superficial.** Los dos más conocidos son el de las gotas y el de los *capilares. Método de las gotas.* Se funda en lo siguiente: si dejamos salir un líquido de un recipiente o de una pipeta por una abertura capilar, de tal modo que salga a gotas, éstas se forman, como sabemos, poco a poco y van agrandándose hasta que por fin caen. Esta caída nos indica que el peso de la gota se ha hecho superior a la tensión superficial del líquido, que era la que le sostenía. A gran tensión corresponderán gotas mayores y, por lo tanto, menor número para un volumen dado. Se utiliza mucho para esta clase de estudios el **Stalagmómetro de Traube.** La figura 44 basta para darse cuenta de lo que es; se ve en ella que la abertura capilar de salida está hecha

a través de una superficie plana y lisa cuyo único objeto es regular mejor la formación de la gota. Se absorbe el líquido, cuya tensión superficial se quiere medir, hasta por encima de la marca *m*, y luego se deja escapar a gotas; cuando enrasa con *m* se empiezan éstas a contar, y se continúa contando hasta que enrasa el líquido con la marca inferior *n*. De ordinario sucede que al enrasar el menisco líquido con *m*, no suele coincidir el momento del comienzo de la formación de la gota, por eso hay que fijarse atentamente cuando comienza ésta, y leer entonces el enrase del menisco por encima o debajo de *m;* lo mismo sucederá con *n*, y es claro que habrá que añadir o restar del resultado final, las fracciones de las escalas anotadas según el buen sentido lo indique. Así, supongamos que las gotas contadas son 25,

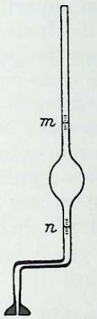
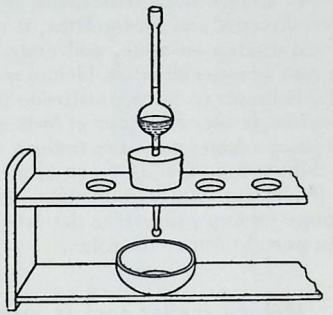


FIG. 44
Estalagmómetro de J. TRAUBE.
1/5 del tamaño natural


FIG. 45
Pipeta cuentagotas

y que el comienzo de la primera coincidió con el enrase del menisco dos divisiones por encima, o sea antes de llegar a *m*, y que, en cambio, la última cayó 4 divisiones antes de *n*, el resultado numérico final será 25-0,2 + 0,4 = 25,2. Llamemos a este número 25,2 = *n* y al encontrado para el agua destilada n_a. Para comparar ambos es claro que tendremos que tener en cuenta la densidad del líquido, pues es evidente que este factor hace que gotas de igual volumen pesen más o menos. Como la densidad del agua destilada es la unidad, la fórmula sería:

$$\text{Tensión superficial} = \frac{n_a}{n} \times D$$

siendo *D* la densidad del líquido que investigamos. En muchísimos casos lo que nos importa es sólo el valor relativo de la tensión, es decir, el resultado de comparar ésta con la de otro líquido, medidas ambas por el número de gotas y se utiliza entonces la **pipeta cuentagotas** (fig. 45); ejemplo: Queremos ver el efecto de la tributirina (éter formado por la glicerina y tres moléculas de ácido butírico) sobre la tensión superficial del agua,

comenzamos preparando una disolución saturada, después preparamos concentraciones menores, haciendo en diferentes tubos de ensayo las siguientes mezclas :

Número de los tubos de ensayo....	1	2	3	4	5	6	7
Solución saturada de tributirina	10 cm.³	8	6	4	2	1	0
Agua destilada.....	0	2	4	6	8	9	10
Número de las gotas obtenidas (valor medio según experiencia personal)..	137	131	124	116	104	98	93

Podemos llevar estos resultados a una cuadrícula en la que una de las coordenadas es la concentración de la tributirina por 10 cm.³, y la otra el número de gotas y obtendremos una gráfica que representará el efecto de la tributirina sobre la tensión superficial del agua. Inversamente con esta gráfica, si nos dan una disolución desconocida de tributirina en agua, podremos por el número de gotas, averiguar sin más su concentración. Hemos escogido este ejemplo porque P. Rona y L. Michaelis, lo han utilizado para seguir la marcha de la descomposición de este éster por el fermento *lipasa* del suero sanguíneo. Con las precauciones que ellos indican (1) añadían a una solución saturada de tributirina en agua y con la mezcla de fosfatos reguladora de iones H (2), cierta cantidad medida del suero a investigar y medían las concentraciones sucesivas del éster, o sea la marcha de la descomposición por el número de gotas.

Método capilar para la medida de la tensión superficial

La tensión superficial es la que hace que un líquido suba en un tubo capilar, si moja sus paredes, en efecto : el que un líquido moje o no moje un sólido depende sólo de que la atracción que las moléculas de éste ejerce sobre las de aquél en la superficie de separación, sea mayor que la que las moléculas del líquido ejercen sobre las suyas propias en ese mismo lugar; por lo tanto, la mojadura en el tubo capilar podría tener lugar elevándose sólo una finísima capa del líquido atraída por el sólido, pero con esto se aumentaría mucho la superficie libre del líquido, a lo cual se opone precisamente, como sabemos, la tensión superficial, la cual consigue este efecto elevando toda una columna del líquido en el interior del capilar. Este es uno de los ejemplos más claros de que la energía superficial puede como tal energía producir un trabajo. El equilibrio aparecerá cuando se hallen contrarrestados el peso de la columna líquida, el valor de la energía superficial del líquido y el de la fuerza atractiva de las paredes del tubo. Basta comparar la altura que alcanza el líquido a investigar (tomada desde la superficie libre del mismo en la vasija) con la del agua. Siempre esta altura se comprende que estará en razón inversa del peso de

(1) *Praktícum der Physicalischen Chemie*, R. Michaelis. Pág. 66. Springer.
(2) Véase capítulo sobre concentración de iones-H.

la columna líquida, o sea del radio del tubo capilar r y de la densidad del líquido D y, en cambio, estará en razón directa de la tensión superficial T, la fórmula siendo h la altura es $h = \frac{2T}{rD}$, como la apreciación del nivel externo de la superficie libre del líquido de la vasija en la escala del capilar es difícil, lo que se hace en la práctica es comparar los niveles de dos tubos de diferente luz sumergidos al mismo tiempo (fig. 46), si los llamamos 1 y 2 tendremos :

$$h_1 = \frac{2T}{v_1 D} \text{ y } h_2 = \frac{2T}{v_2 D} \text{ y } h - h_2 = \frac{2T \times v_2 D - 2T \times v_1 D}{v_1 0 \times v_2 D}$$

$$= \text{sacando } \frac{2T}{D} \text{ en factor común } = \frac{2T}{D} \times \left(\frac{1}{v_1} - \frac{1}{v_2}\right) = \frac{2T}{D} \times \frac{v_2 - v_1}{v_1 - v_2}$$

como $\frac{v_2 - v_1}{v_1 - v_2}$ si trabajamos con dos tubos conocidos (fig. 46) lo podemos averiguar de una vez para siempre lo podríamos llamar K y entonces $h_1 - h_2 = \frac{2T}{D} \times K$

de donde $2T = \frac{h_1 - h_2}{K} \cdot D$.

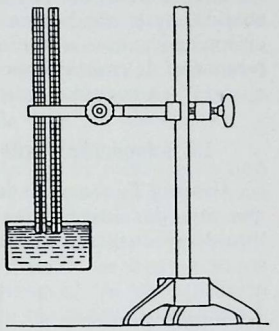


Fig. 46. Doble tubo capilar

Si tomamos como tipo el agua, hallamos de una vez con esta fórmula el valor de T para ella y éste nos servirá para divisor del encontrado para nuestro líquido. Ejemplo : dos tubos cuyo diámetro sea respectivamente de 2,5 y 0,4 mm. (son los usuales) dan a 18° una diferencia de altura con el agua de 36,5 milímetros, la solución saturada de alcohol amílico en agua da 13,4 ; la tensión superficial de esta solución será $\frac{13,4}{36,50} = 0,367$. Aquí hemos prescindido de comparar las densidades de ambos líquidos y esto se hace siempre, pues en tan pequeños volúmenes tal factor es despreciable. Como se ve, pues, prácticamente, se miden sólo diferencias de altura, y se divide por las del agua.

Influencia de ciertas substancias sobre la tensión superficial del agua y su importancia

La mayoría de las substancias disueltas en ella obran como en el ejemplo antes citado, *disminuyendo* la tensión superficial, elevándola muy pocas. Los primeros se llaman *activos sobre la tensión superficial* o *capilares activos* (ya se ha visto que influyen en los fenómenos capilares). Y se caracterizan por su *gran adsorbilidad* y por su acción

biológica grande, los más activos, suelen ser narcóticos frenadores de la respiración interna con el O_2. Con la vejez de la disolución, varía en general el valor de su tensión. Se ha observado que las substancias que más disminuyen la tensión superficial del agua, suelen ser compuestos ricos en carbono, y tanto más activos cuanto más larga es la cadena de C, y cuanto menor es el número de grupos decididamente electropositivos que encierra su molécula, y entre los electronegativos cuanto menor es el número de los OH y COOH. Respecto a los coloides, diremos que los suspensoides, oro, platino, hidróxido de hierro coloidal, etc., no modifican la tensión superficial del agua. En cambio, las soluciones de emulsoides como dextrina, gelatina, hemoglobina, albúmina, poseen menos tensión superficial que el agua pura, son pues capilares activos. Como hemos dicho antes, *no se sabe el porqué* de ninguna de esta influencias y, sin embargo, se han deducido de tales fenómenos consecuencias muy interesantes para la química coloidal, por eso hemos tratado de ellos algo detenidamente. Especialmente vamos a ver que tienen una relación directísima con un fenómeno de capital importancia en Biología y Medicina del que vamos a tratar en seguida, éste es

La adsorción y sus relaciones con la tensión superficial

Gibbs y Thomson dedujeron, por consideraciones de termodinámica, que aquellas substancias que disminuyen la tensión superficial de un líquido se dirigen a las superficies limitantes de él (esquema *a*) (fig. 47)

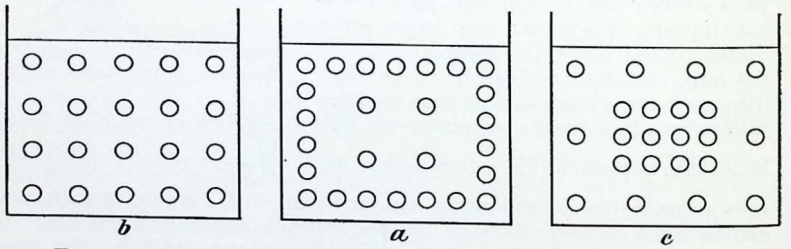


Fig. 47. Esquema para explicar la adsorción (im. de Wo. Ostwald)
b, repartición indiferente de las partículas ; *a*, adsorción positiva ; *c*, adsorción negativa

así que su concentración allí será mayor que en el centro; en cambio, aquellas que aumentan la tensión superficial del líquido pierden en concentración en la superficie (esquema *c*). *Este aumento de concentración en la superficie limitante de dos fases es lo que se llama más ampliamente adsorción positiva* : en el caso *c*, de la figura, diremos que hay *adsorción negativa*. El teorema de Gibbs y Thomson dice por lo tanto, así : « Las substancias que disminuyen la tensión superficial de un líquido son adsorbidas positivamente, y las que la aumentan

negativamente ». Ya veremos al hablar de las teorías de la adsorción que hay, sin embargo, algunas excepciones a esta ley. Para tratar de explicarnos tales fenómenos de un modo elemental podemos hacernos las consideraciones siguientes. Acabamos de decir, al hablar de la tensión, que : Energía superficial=tensión s × superficie. Como en la Naturaleza se tiende al ahorro de energía, la energía superficial de un líquido puro, agua, alcohol, etc., será la mínima cuando los factores que la integran tengan el valor mínimo; como su tensión superficial es forzosamente constante, se consigue el mínimun de energía llevando la superficie al mínimo; por eso adopta una gota la forma esférica. En el caso de una solución, tenemos que el líquido ha conseguido ya la superficie mínima, por eso a lo disuelto para disminuir la energía superficial no le quedará más camino que disminuir la tensión superficial. Si lo disuelto es una substancia de las que disminuyen ésta, tanto más cuanto más concentradas estén, es lógico deducir que se condensará en la superficie para producir el efecto máximo. Este es el caso más general, pero hay algunas substancias que aumentan la tensión superficial a costa de otra energía, que ellos perderán ; la consecuencia es que evitarán este aumento disminuyendo su concentración en la superficie huyendo de ella, por decirlo así, y por lo tanto, tendrán que acumularse en el centro (esquema *c*).

En cualquiera de estos casos, es evidente que se establecerá una lucha entre esta tendencia a la concentración desigual en la periferia o en el centro respecto al resto del líquido, y la difusión que tiende a una repartición igual de las moléculas en él. Por eso, en ningún caso sucede que todas las partículas del cuerpo disuelto se acumulan en la periferia o en el centro, sino que se establece al fin un equilibrio entre ambas tendencias, predominando según los casos la concentración en la superficie (los que disminuyen la tensión superficial llamados también capilares activos), o en el centro (capilares inactivos).

Este se puede decir que es el concepto teórico de la adsorción ; vamos a ver un *caso práctico*. Preparamos una solución de un colorante, sea el azul de metileno al 1/10.000 (tipo colorante básico); o de rojo de congo al 1/10.000 (tipo de colorante coloidal) y lo filtramos a través de carbón animal en polvo, observaremos que la solución pasa completamente incolora. Lo mismo hubiese sucedido de haber echado la solución en un frasco y haberla agitado, por ejemplo, tres minutos con el polvo de carbón animal, dejando luego decantar tal mezcla o filtrándola a través de papel filtro para separar el carbón, la solución aparece incolora. ¿Qué ha pasado con el colorante? Como aquí hay dos fases, una sólida, carbón, y otra líquida, agua, el colorante que disminuye la tensión superficial de ésta, se ha acumulado totalmente en la superficie de separación de ambos, es decir, alrededor de cada esferilla de carbón, y luego por causas hoy desconocidas, pero sobre las que hay teorías que luego expondremos, ha sido retenida por el carbón al separarlo del líquido. Nótese que es completamente diferente el fenómeno de la *adsorción* en

el que las partículas quedan en la superficie, sea del carbón (*a* fig. 48), de la *absorción* en que aquéllas entran en las esferillas de éste (*b*). Cuando se trata de partículas pequeñas no es fácil muchas veces distinguir sin más, un fenómeno de otro, y aun hay casos en que coexisten las dos, por eso se ha propuesto por algunos el nombre de *sorción*, que reúne a ambos. Un caso ideal para ver prácticamente la diferencia, es el siguiente en el que se verá fácilmente el caso de *adsorción* de un cuerpo de dispersión grosera en la superficie de separación de dos líquidos: Se hace una suspensión de carbón animal muy fino (es decir, triturado insistentemente en el mortero) en agua al 1/100, se agita bien y se consigue obtener una suspensión bastante estable, pues necesita bastante tiempo para depositarse, luego se agita esta suspensión con 15 cm.³ de benzol, xilol o cloroformo, y se deja todo en reposo, al poco tiempo, se ve que todo el carbón se ha concentrado en la superficie de separación de los dos líquidos. Con el benzol y xilol resulta la experiencia más concluyente, pues por ser más ligeros que el agua se superponen a ésta. Si en vez de *adsorción* hubiese habido *absorción*, es decir, *difusión* del carbón en el benzol, xilol, etc., se verían allí las partículas del carbón y no agrupadas en el límite de separación. Puede servir esto para separar diferentes substancias en suspensión en un líquido por su diferente adsorbilidad por otro, y de hecho hay en minería ciertos métodos basados en tal propiedad.

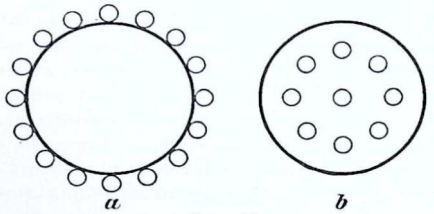


FIG. 48
a, adsorción; *b*, absorción

Si la fuerza adsortiva no es grande se puede recuperar la substancia adsorbida (en nuestro ejemplo primero el colorante) hirviendo el carbón que lo retuvo, en agua.

Medida de la adsorción

El poder adsorbente de un cuerpo, sea el carbón, para con otros, sea el azúcar, alcoholes, tributirina, polypéptidos, etc., *se mide*, sin más que agitar en un frasco, como hemos dicho, cantidades perfectamente conocidas del adsorbente y soluciones perfectamente dosificadas del adsorbido, se filtra luego el todo, y en lo filtrado se ve lo que ha perdido en concentración la solución. Se comprende que tal medida de la concentración de la solución requiere como los datos anteriores análisis muy precisos. Este es el método que pudiéramos llamar directo, pero se comprende que teniendo en cuenta lo dicho respecto a las relaciones entre tensión superficial y adsorción, se pueda tener una idea de ésta midiendo el valor modificador de aquélla por la substancia a adsorber. Ahora, que ya sabemos que tal relación

no es aplicable a todos los adsorbentes. Un medio práctico y rápido para averiguar la adsorbilidad de una substancia, consiste en disolverla en agua, y echar una gotita de la solución sobre el papel secante. Si la substancia no es adsorbible por la celulosa del papel, veremos que la solución íntegra, es decir, disolvente y disuelto, se extienden igualmente por capilaridad, en el secante, y la mancha tendrá igual color en todas sus partes. Si en cambio, lo disuelto es rápidamente adsorbido por el papel, veremos como el disolvente se extiende con mucha más velocidad mojando el secante, produciendo una mancha con dos tonos, uno externo, más claro, producido sólo por el disolvente, y otro en el centro, más obscuro, que será producido por la solución total, cuyo disuelto no se ha extendido por estar retenido por adsorción. Se ve esto más claro todavía si la substancia disuelta fuese un colorante. Claro que este procedimiento indica sólo la adsorbilidad de la substancia por la celulosa y en solución acuosa, pero en general la adsorción celulósica es paralela a la del adsorbente más usado en los laboratorios que es el carbón animal y también las soluciones más usadas son las acuosas. Pero es evidente que en las investigaciones precisas debe utilizarse sólo el método directo.

El estado coloidal y los procesos adsortivos

Acabamos de ver que la adsorción se verifica en la superficie de contacto de dos fases, su intensidad será tanto mayor cuanto mayor sea esta superficie, y precisamente el estado coloidal crea el máximum de superficie aprovechable, debido al enorme grado de división de la materia en él. Y es este aumento de la superficie el que da el carácter a casi todos los fenómenos coloidales.

Para darnos cuenta del enorme aumento de superficie que representa la división progresiva de la materia, copiaremos el cuadro de W. OSTWALD que da el creciente valor de la superficie de un cubo, que lo dividimos sucesivamente en otros, cuyos lados son cada vez la décima parte del anterior, pero conservando la suma de sus volúmenes siempre el valor del del cubo primitivo, en el caso que vamos a exponer un cm.³

Longitud del lado		Núm. de cubitos	Superficie total	Superficie específica
1 cm.		1	6 cm.²	6
1 mm.	$=1\times10^{-1}$ cm.	10^{3}	60 »	6×10
0,1 »	$=1\times10^{-2}$ »	10^{6}	600 »	6×100
0,01 »	$=1\times10^{-3}$ »	10^{9}	6000 »	6×1000
1 micra	$=1\times10^{-4}$ »	10^{12}	1 »	6×10^{4}
0,1 »	$=1\times10^{-5}$ »	10^{15}	60 »	6×10^{5}
0,01 »	$=1\times10^{-6}$ »	10^{18}	600 »	6×10^{6}
1 $\mu\mu$ (1)	$=1\times10^{-7}$ »	10^{21}	6000 »	6×10^{7}
0,1 »	$=1\times10^{-8}$ »	10^{24}	6 Hm.²	6×10^{8}
0,01 »	$=1\times10^{-9}$ »	10^{27}	60 »	6×10^{9}
0,001 »	$=1\times10^{-10}$ »	10^{30}	6 Km.²	6×10^{10}

(1) $1\,\mu\mu = 0{,}001$ de micra, o sea 0,000001 de mm.

Como sabemos que el estado coloidal comprende las partículas comprendidas entre 0,1 micra y 1 $\mu\mu$, si suponemos un cubo de oro metálico de 1 cm.^{3} y le hacemos, por división, llegar a la dimensión coloidal, en que cada lado del cubo tuviese 10 $\mu\mu$ o sea 0,01 micra, su superficie, según el cuadro, se habría hecho 6×10^6 mayor, es decir, valdría 600 m.^{2} El almidón cuya molécula se admite que tiene un diámetro de 5 $\mu\mu$, adquiriría al disolverse 1 cm.^{3} de él, una superficie de contacto con el agua de 1,000 m.^{2} Y si aceptamos como valor medio molecular $= 1 \times 10^{-8}$ cm. tendríamos que 100 cm.^{3} de una solución de azúcar al 10 % presentaría una superficie de contacto con el agua de 50 hectáreas, admitiendo que las moléculas de azúcar, tuviesen la forma esférica que es la forma que a igualdad de volumen posee menor superficie. Para los iones y electrones debe existir también, indudablemente, una heterogeneidad en su contacto con el agua y en ellos dado su pequeño volumen debe alcanzar su superficie enormes extensiones.

Tengamos en cuenta que los fenómenos de tensión superficial se verifican en cada superficie de contacto de dos fases diferentes, así que una solución de un coloide contenida en un vaso presenta tres cambios de fases importantes, uno entre el líquido y el aire (superficie libre del líquido), otro entre el líquido y las paredes del vaso, otro entre el líquido o sea el medio dispersante y las partículas dispersas del coloide. Como las partículas coloidales pueden a su vez tocar el aire o las paredes del vaso, aparecen otros dos cambios de fase, o sea 4 nuevas superficies que con las 6 anteriores hacen 10. Si aumentan las fases del dispersoide entonces aumentan mucho las superficies diferentes. Pero no todas son igualmente interesantes para nosotros, así el cambio de fase líquido-paredes del vaso, podría tener importancia para la mojadura de éste, el cambio líquido-gas o aire puede ser interesante porque la adsorción en él produce a veces finas películas del adsorbido en la superficie libre del líquido; pero el de gran valor para los fenómenos de adsorción por la enorme extensión que representa, es el cambio de fase líquido-coloide.

Tiene, sin embargo, un límite este aumento de la adsorción, con el de la división de la materia, pues cuando ésta llega al grado de dispersión molecular, se considera que el conjunto se hace homogéneo para este aspecto, es decir, que ya no existen allí dos fases, y, por lo tanto, que no hay superficies de separación entre ellas así que el fenómeno de la *adsorción* desaparece al traspasar la materia el estado coloidal, por eso decíamos al principio que este estado representaba el *máximun de superficie aprovechable*. Sin embargo, para los que creen que la base de la adsorción es la afinidad química no habría tal distinción entre los estados coloidal y molecular en este aspecto. Pero hay un hecho notable en apoyo del primer concepto, y es que hay ciertos catalizadores como el platino, que sólo lo son en estado coloidal, y pierden tal estado al llegar al molecular, y precisamente se cree que tal catálisis en este caso es una catálisis por adsorción. Debe haber, pues, aquí algo más que afinidades químicas.

Isoterma de la adsorción de Freundlich

Si tenemos una solución y le añadimos un adsorbente del cuerpo disuelto, se establecerá al fin un equilibrio entre la atracción de éste por el adsorbente de una parte, y la tendencia natural de las partículas o moléculas disueltas a esparcirse en el disolvente por difusión, de otra. Pues bien; existe una fórmula empírica que relaciona la cantidad de soluto adsorbida (sea x) con la cantidad del adsorbente (m), y con la concentración (c) de lo que del cuerpo disuelto queda todavía libre en solución. Esta fórmula es : $\frac{x}{m} = K \cdot c^n$, en la que K y n son dos constantes que hay que averiguar en cada caso dependientes de la naturaleza del adsorbente, y si este fuese carbón, de su naturaleza, dependiente de su estado de división, procedencia, etc. (K), y de la del cuerpo disuelto (M). Tomando en un sistema de coordenadas, los valores de log c como abscisas y los de log $\frac{m}{x}$ como ordenadas, tendremos una representación gráfica de la curva correspondiente a aquella fórmula (fig. 49).

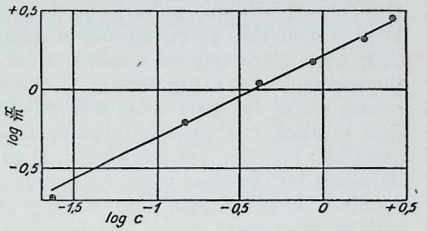


FIG. 49. Isoterma de la adsorción de la acetona por el carbón

Se le llama isoterma de la adsorción porque es válida sólo para una misma temperatura. Esta fórmula es importante, porque siendo típica del fenómeno de la adsorción, nos servirá en un momento dado para distinguir este fenómeno del de absorción, combinación química, etc., cuya distinción ya sabemos que en muchos casos es extremadamente difícil. Debiendo advertir que como se pueden presentar simultáneamente estos tres fenómenos, entonces la ley dada sufrirá una desviación y habrá perdido en estos casos su valor diagnóstico.

Teorías de la adsorción

¿De qué fuerza disponen las partículas coloidales, o las de mayor tamaño, para atraer hacia sí o retener en su superficie a las partículas adsorbidas, sea del grosor que sean? Dos tendencias se advierten en las teorías explicativas de la adsorción. Unos dicen que las causas que motivan el fenómeno de la adsorción son de *orden físico*. Otros invocan como fuerza atrayente y retentiva a la *afinidad química* sobre todo, los que esto defienden establecen así el puente de unión entre la química coloidal y la clásica. Muchos creen que coadyuvan fuerzas de los *dos órdenes*.

Teorías físicas

a) *Mecánicas* (1). Los que esto defienden parten del hecho antes citado, de la desigual repartición de las partículas disueltas en un líquido, cuando, además de ellas, existe otra fase. Sabemos que se colocan en la superficie de separación de ambas fases o se separan de ella según su acción sobre la tensión superficial del líquido. Esto, como sabemos, es un hecho comprobado, y, por lo tanto, representando las partículas coloidales, o las del carbón animal, un cambio de fase respecto al líquido, nada tiene de particular que se agrupen las partículas disueltas en él, alrededor de aquéllas o que se separen de sus cercanías. Pero esto no explicaría las adsorciones selectivas, es decir, dependiendo tal acumulación o tal repulsión, únicamente de las relaciones entre las partículas adsorbidas y la tensión superficial de la fase líquida, cualquier cambio de fase adsorbería indiferentemente a aquéllas; por eso, sea cualquiera el coloide que adsorbe, la adsorción debe ser indiferente, y tal no sucede así. Tal coloide atrae con preferencia a tal substancia y no a otra, y otro coloide hará lo contrario. Tal objección es seria, y por eso hoy hay cierta tendencia a hacer intervenir la afinidad química para explicar esta selectividad, pero nuestro desconocimiento de las relaciones interfaciales es casi absoluto, y nada tendría de raro que las variaciones de tensión entre un líquido, sea el agua y coloide, sea la gelatina, fuesen completamente diferentes que las del mismo líquido con otro coloide, y, por lo tanto, la repartición de las partículas disueltas en el agua, o sea en definitiva la adsorción, sería diferente en los dos casos.

Teorías eléctricas

Ya hemos dicho en el capítulo en que se trataba de fenómenos eléctricos en los coloides, que las partículas coloidales poseen cierta carga eléctrica, y sabemos que los iones también la poseen, nada tiene de particular, por lo tanto, que haya atracciones y repulsiones entre ellos, como las hay entre las partículas coloidales mismas, y entre los iones entre sí. Al tratar de la precipitación de coloides por la acción iónica, decíamos que un coloide de carácter eléctrico positivo muestra una sensibilidad particular ante elementos electronegativos y viceversa, y que partículas de diferente signo deben en efecto atraerse y reunirse. Tales hechos aclaran indudablemente muchos casos de adsorción, pero la atracción de moléculas no ionizadas, es decir, sin carga eléctrica, no es explicable con esta teoría ni tampoco la electividad de la adsorción. Muchos advierten, además, que se ha extendido quizá con exceso la idea de que es siempre adsorción lo que se verifica al tratarse de iones. Así, R. Zsigmondy dice que la llamada adsorción de elementos radiactivos por el B_aSO_4 no es tal, pues estos

(1) Al hablar de las teorías químicas de la adsorción expondremos las reglas de Freundlich, base de esta hipótesis de la adsorción.

elementos poco a poco se *introducen* en la red del cristal. J. Loeb y su discípulo R. Beutner, dicen algo parecido para el caso de los albuminoides y de las grasas cuando indican : es evidente que las proteinas son precipitadas por la acción de iones en muchos casos; pero esto no permite afirmar con certeza que al fenómeno de la floculación o precipitación haya precedido uno de adsorción, y R. Beutner va más lejos al afirmar su creencia de que la carga eléctrica de gotitas de aceite emulsionadas en agua depende más que de la adsorción por ella de determinados iones, de la *introducción* paso a paso de las sales dentro de la gota de aceite. Nos encontramos aquí con la dificultad de distinguir la *adsorción* de la *absorción*.

Teorías químicas

Michaelis y Rona establecieron una teoría basada en la afinidad química cuya idea les fué sugerida al estudiar los casos en que no se cumplían las reglas de Freundlich, base, por decirlo así, de la teoría mecánica de la adsorción. Estas son :

Primera. La adsorción de una substancia disuelta es en gran manera independiente de la naturaleza química del adsorbente, el cual obra sólo por el aumento de la superficie de la solución.

Segunda. La adsorbilidad de una substancia disuelta es paralela a su poder modificador de la tensión superficial. En realidad, vemos que ambas reglas, pero sobre todo la segunda, son consecuencia del teorema de Gibbs, que citábamos al principio. Michaelis y Rona observaron que en muchos casos la adsorción no es tan independiente del adsorbente como establece la primera regla de Freundlich, ya que el carácter eléctrico de este influye, por ejemplo, en muchos casos decisivamente. Vieron también que muchas sales neutras, sin influencia ninguna sobre la tensión superficial del agua o aun elevadoras de ésta eran bien adsorbidas por ciertos cuerpos, así : el caolín, el óxido de hierro coloidal, no adsorben en absoluto la tributirina, ni la acetona y, sin embargo, disminuyen ambas (sobre todo la primera) considerablemente la tensión superficial del agua. Debían, por lo tanto, según la segunda regla de Freundlich, ser fuertemente adsorbidas por aquéllos. Viceversa, existen substancias, en especial no electrólitos, como el azúcar, sin actividad, o con muy escasa acción respecto a la tensión superficial del agua y que, sin embargo, son muy bien adsorbidas por el carbón. Por lo cual buscaron el motivo de la fuerza adsortiva en la afinidad química, llegando a decir : « La cualidad del carbón que denominamos adsortiva, no es más que el equivalente de la afinidad química libre a temperaturas bajas. Es, pues, injustificado establecer distinción ninguna entre las uniones adsortivas y las químicas ». Añaden luego, al discurrir sobre la fácil adsorción del azúcar y de compuestos ricos en carbono por el carbón : « Parece como si la adsorción del carbón, fuese en estos casos una expresión de la afinidad para sí mismo, afinidad que aparece clarísimamente en la química

orgánica por la tendencia que tiene a formar cadenas, anillos, etc., en que entran muchos átomos de C cuya afinidad para sí mismo no existe en otros elementos». Ya dijimos que las substancias más activas respecto a la tensión superficial del agua, eran las más ricas en carbono, y a esta riqueza creen ellos que es debida su fácil adsorbilidad por él mismo. En otro lugar hacen notar : « El carbono adsorbe indiferentemente iones positivos y negativos, del mismo modo que el átomo de C se combina indiferentemente con elementos electropositivos y electronegativos y con toda clase de radicales ».

Para algunos adsorbentes como el ácido silícico o el hidróxido de hierro coloidales, admiten que la adsorción por ellos de colores básicos es producida por afinidades químicas de impurezas que les acompañan aún en los preparados más limpios de ellas y que son en el primer caso una sal de calcio y en el segundo el cloruro de hierro básico. Y estos mismos adsorbentes y otros como el M_nO_2, el CO_3Ca, el B_aSo_4, son, como decíamos para el caolín, de los que no adsorben o muy poco, substancias no electrólitos como la misma tributirina, el heptilalcohol el optilalcohol.

Una objeción seria a esta teoría es que existen substancias que son catalizadores enérgicos sólo en estado coloidal y al pasar a moléculas dispersas dejan de serlo ; como ya decíamos antes, químicamente no se diferencia la substancia en uno u otro estado, la diferencia debe radicar en otra cualidad, y como hoy se admite que el papel catalizador de estas substancias se debe o es paralelo a su poder adsorbente, es natural pensar que desaparece la catálisis porque no hay adsorción en el estado molecular, o sea porque no hay afinidad química, y sin embargo, existe adsorción en el estado coloidal, es decir, ambos fenómenos en este estado no van paralelos, luego no serán idénticos.

Teoría de Langmuir. Ideas de Harkins

Es muy curiosa la explicación que da el primero de la adsorción, basándose en la afinidad química. Supone que el adsorbente obra por las *afinidades libres* que salen, por decirlo así, de sus partículas y consecuente con esta idea afirma que la capa de un gas adsorbida por un sólido y que rodea, por lo tanto, sus partículas, no puede tener más espesor que el de una molécula, pues es lógico pensar que cada valencia libre del adsorbente quedaría saturada con una de la molécula por ella retenida. El ha aplicado a la adsorción las originales ideas de Harkins respecto a la orientación de las moléculas que ocupan la superficie de un líquido. Harkins cree que las moléculas se orientan en estas superficies, de modo que el grupo atómico menos activo está dirigido hacia la fase gaseosa. Así, en los derivados de la parafina, las moléculas superficiales se orientan dirigiendo, los grupos CH_3 hacia afuera (hacia el aire o gas) y los grupos activos COOH, NH_2, C, N, etc., hacia el líquido. Si la molécula fuese monoatómica y simétrica, su orientación dependería de la situación de los campos electromagnéticos del átomo. Si las dos fases fuesen líquidas y una de ellas orgánica, por ejemplo, benzol y agua, y lo adsorbido fuese una sal orgánica, entonces el radical orgánico de ésta se dirige hacia el líquido orgánico y el otro hacia el agua; así, el oleato sódico en este caso se orientaría con la cadena de carbono dirigida hacia el benzol y el sodio hacia el agua. Para Langmuir sucedería una cosa parecida en el caso de la adsorción, o sea que la dirección y aun la forma de la molécula deben, según él, jugar un papel muy importante en aquel fenómeno. Estas curiosas ideas, sobre todo la referente a que el grosor de la capa adsorbida es de una sóla molécula, y a la orientación de éstas, van abriéndose cada vez más camino entre los químicos coloidales, pues los físicos teorizantes la prefirieron ya desde hace tiempo. Cualquiera de estas teorías explica algunos hechos, pero es impotente para alcanzar a todos; parece que lo cierto debe estar en reunirlas para formar un cuerpo de doctrina común y completar las unas con las otras, tal es el origen de las

Teorías mixtas de la adsorción

Lo que tienen de común todas estas fuerzas que provocan las variaciones de concentración en las capas limitantes de dos fases, cuyas variaciones hemos denominado nosotros del modo más general como « fenómenos de sorción » es que obedecen al siguiente principio, que no es sino la generalización del ya enunciado teorema de Gibbs : *Siempre que exista en una superficie limitante un potencial de una energía cualquiera, cuyo potencial pueda ser disminuido por una variación en la concentración del dispersoide adyacente, tendrá lugar esta variación, es decir, se verificará allí una adsorción.* Así, por ejemplo, si introducimos un cuerpo sólido en un líquido, respecto del cual aquél posee cierta carga eléctrica, creándose, por lo tanto, entre ellos una diferencia de potencial, y existiese en el líquido una fase dispersa, de carga eléctrica opuesta a la del sólido, evidentemente podrían las partículas dispersas disminuir la diferencia de potencial entre el sólido y el líquido sin más que agruparse en la superficie limitante de ambos porque neutralizarían, por lo menos en parte, la carga eléctrica de aquél. Tales condiciones serían las precisas para que existiese una *adsorción eléctrica.* Si suponemos nosotros dos substancias, sean dos líquidos no miscibles en cuyas superficies de contacto existiese la tensión superficial mecánica corriente, y uno de los dos líquidos fuese un dispersoide, cuya tensión superficial contra el segundo líquido podría ser disminuída por una elevación de la concentración de la fase dispersa de éste, en la superficie limitante de ambos, entonces tendrá lugar tal aumento de concentración allí, es decir, se verificará una adsorción positiva. Estas son las condiciones de aparición de la *adsorción mecánica.* Si en la superficie limitante entre el adsorbente y el dispersoide, existiese una diferencia de potencial químico, es decir, que se verificase en ella una reacción entre ambos, que como la mayor parte de

ellas iría tanto más de prisa cuanto mayor fuese la concentración allí del dispersoide, se verificaría en la superficie limitante dicha una acumulación de la fase dispersa de éste, es decir, aparecería una *adsorción química*.

Lo mismo podríamos decir para los potenciales térmicos, para los nacidos a consecuencia de las diferencias de absorción de energías radiantes de cualquier orden, en las superficies límites, etc.

Debe existir, por lo tanto, una serie completa de causas de adsorción, las cuales pueden coordinarse, pero pueden también a veces oponerse entre sí (tal sucede sobre todo, cuando en la capa límite aparecen diferencias de potencial eléctrico y de tensión superficial simultáneamente).

Se debe distinguir, por lo tanto, en cada caso, la clase de energía que engendra la adsorción.

Antes de pasar a otra cosa, conviene fijar la atención en algunos casos curiosos de adsorción, que resultan, cuando se verifican entre dos coloides, y aun entre un coloide y un molecular disperso, en los que cabe preguntar cuál de las dos partes es el adsorbente y cuál la adsorbida. Pues, evidentemente, cuando la adsorción se verifica entre partículas de sistemas de gran dispersión, desaparece la diferencia entre adsorbente y adsorbido, exactamente igual a lo que sucede en la unión química de moléculas. La analogía entre ambos fenómenos va más lejos. La consecuencia natural inmediata de la adsorción recíproca de dos fases es una disminución en la dispersión del sistema total, pudiendo llegar a producirse un precipitado, como ya se ha visto al hablar de la precipitación recíproca de dos coloides cargados con electricidades de signo contrario. Ahora bien; la experimentación ha demostrado que tal precipitación sólo tiene lugar por completo, para concentraciones muy precisas, y la relación entre las proporciones de ambos ha dado en algunos casos números de acuerdo con las leyes stochiométricas, es decir, con las leyes que rigen las reacciones de la química clásica atómica. Así que tales uniones de coloides se parecen, en estos casos, muchísimo a las uniones químicas entre moléculas, lo cual nos conduce a indicar que en muchos casos, es muy difícil precisar si un precipitado que se nos forma, es ocasionado por simple reacción química o producido por uniones de orden físico adsortivo. Es decir, que no hay una transición brusca, sino toda una serie de grados intermedios entre las reacciones químicas puras, y las coloidales, existiendo un parentesco evidente entre ambas en muchos casos.

Importancia biológica de estos hechos

Antes de señalar sus aplicaciones en Medicina y Biología conviene recalcar el enorme interés, de una consecuencia de la adsorción, es decir, de la **catálisis por adsorción** en la historia de nuestro quimismo, ya que los fermentos se admite hoy que es de este modo que realizan

su enigmática labor. No se puede entrar aquí en estudiar las razones que ha habido para llegar a creer con gran verosimilitud que los fermentos son catalizadores, y que entre los diversos medios de catálisis existentes deben realizar aquéllos su labor acelerando las reacciones por adsorción. Remitimos al lector para ello al capítulo II de la Parte segunda de esta obra. La cuestión que está mucho más próxima a nuestro objeto es la siquiente : ¿Por qué aparece una actividad química tan grande en la zona de adsorción? Para muchos la causa de aceleración de las reacciones por adsorción, o sea de la catálisis por adsorción, está en la aproximación grande de las moléculas reaccionantes entre sí, al ser condensadas en virtud de este fenómeno alrededor del adsorbente ; tal acción es invocada sobre todo para explicar las reacciones entre dos gases, provocadas por la presencia de un adsorbente de ambos. Ahora bien; se conocen también casos de retardamiento de reacciones por la influencia de un adsorbente, así, por ejemplo, KRUYN y DUIN han demostrado la acción retardatriz del carbón en polvo finísimo sobre algunas reacciones, como la saponificación del acetato de etilo y otras; ambos autores niegan que la causa única de la acción catalítica sea la condensación provocada por la adsorción, piensan que debe influir también mucho la colocación específica que admiten LANGMUIR y HARKINS alrededor de las superficies limitantes, por lo cual resulta que aun existiendo siempre aproximación de las moléculas reaccionantes por la acción del asdorvente, las reacciones son aceleradas o retrasadas según la posición relativa de ellas.

Otra explicación de la aceleración de la reacción por la adsorción es la que invoca la elevación de la temperatura producida por la condensación de las moléculas alrededor del adsorbente, pero LOEB hace notar que la elevación de temperatura, producida al ser condensado por adsorción el vapor puro de alcohol por el negro de platino, no alcanza ni con mucho a explicar la combustión de los vapores de alcohol que se observa al ser adsorbidos éstos en el aire por el mismo catalizador; también cree que la teoría de LANGMUIR no casa con esta explicación física de la acción catalizadora de la adsorción.

Para los partidarios de las teorías químicas de la adsorción, la causa de su catálisis sería también puramente química, y el carácter coloidal del adsorbente no tendría más significación que la de ofrecer una superficie enorme que facilitaría mucho las reacciones.

Es sabido que entre los modos de catálisis conocidos por los químicos existe el llamado catálisis por reacciones intermedias, que consiste en que el catalizador reacciona con uno de los cuerpos de la reacción que él activa y el producto de esta combinación luego con el otro, siendo el resultado final el mismo que sin catalizador, pero la velocidad de la transformación primitiva es mucho mayor, a pesar de haberse alargado el camino por la aparición de reacciones intermedias, ya que todas éstas se verifican con gran rapidez. Pues bien; en el caso de las combinaciones aceleradas por adsorción por el musgo de pla-

tino, por ejemplo, suponen algunos que existe una unión intermedia del O con el Pt que avivará en definitiva la oxidación. Tales uniones intermedias se han demostrado ya para el carbono y el oxígeno, así ENGLER vió que el carbón muy dividido adsorbe O_2 y luego al cocerlo en agua se desprende CO_2; había habido, pues, combinación del C y del O. FEIGL, apoyándose en este hecho, dice que las oxidaciones observadas por él, del SH_2, Na_2S, CuS y Cu_2S en presencia del carbón animal, podrían ser provocadas por la unión intermediaria citada entre el C y el O del aire. Otros autores afirman que la lado de la simple adsorción del O por el C existe, como dice ENGLER, formación de CO_2, y además se forman otras combinaciones de estos dos cuerpos más ricos en carbono.

Vemos que según los casos son diferentes las explicaciones dadas para explicar la catálisis por adsorción. Una de las dificultades que se presentan cuando se quiere explicar la acción fermentativa, como un fenómeno de catálisis por adsorción, es la cuestión de la especificidad en la acción de aquéllos, pero ya acabamos de decir que la adsorción misma es selectiva ; así se explica que los fermentos puedan también serlo.

La acción de los *venenos* sobre los fermentos, de los *narcóticos*, que parecen son agentes que deben actuar sólo sobre seres vivientes, se explica fijándose en que pueden obrar siendo adsorbidos con mayor intensidad que el substracto e impidiendo que se verifique la adsorción de éste, necesaria para la catálisis de la reacción, o arrojando, por decirlo así, de la capa límite al substracto, si ya estaba allí concentrado, al tener el veneno más afinidad que éste para con el adsorbente.

El hecho de que todos los fermentos se presentan en estado coloidal, y que según opinión de la mayoría de los autores sea la conservación de este estado algo indispensable para su acción, habla también en favor de la hipótesis catalítica de su acción. Habiendo sido una prueba definitiva para muchos casos, el que se haya demostrado que la velocidad de la reacción fermentativa es paralela a la curva de la adsorción, que resulta de la representación gráfica de la isoterma de la adsorción de FREUNDLICH; parece, por tanto, que en estos casos la velocidad fermentativa depende la capacidad adsortiva del fermento.

Al pasar a otros hechos biológicos en que interviene la adsorción, se debe siempre repetir que el más sencillo hecho biológico es un complejo enorme de fenómenos coloidales, y que si se habla aquí de tal o cual fenómeno vital, es porque en él aparece como principal variante la adsorción, pero coexistiendo con otros muchos. Esto precisamente hace tan difícil la aplicación a los casos vitales de la química coloidal.

Inmunidad y adsorción

No puede ser éste el lugar de exposición de teorías sobre la inmunidad, y de hablar de toxinas, precipitinas, lisinas, aglutininas, anticuerpos, antígenos, complementos, etc., de las cadenas laterales de

EHRLICH, las reacciones llamadas de inmunidad, como las de WASSERMANN, SACHS GEORGI, MEINICKE, de las llamadas reacciones coloidales del suero y del líquido cerebroespinal, en las que se emplean coloides inorgánicos como oro coloidal, azul de anilina, etc. En todos estos casos si el médico o el biólogo lee las explicaciones actuales de tales hechos, se encontrará casi siempre al fin con fenómenos de adsorción, de precipitación de coloides, etc. Las primeras tentativas importantes, de aplicación de la físico-química a la ciencia de la inmunidad data de los trabajos de ARRHENIUS y MADSEN, en 1903, pero no son comparables los conocimientos de aquella época con los de hoy, así que tales ensayos consistieron sólo esencialmente en aplicar las leyes conocidas sobre cinética de las reacciones de la química clásica, a las de inmunidad ; aunque en muchos casos resultó posible tal aplicación coincidiendo los resultados prácticos con los previstos por el cálculo teórico, en otros muchos no se lograron resultados definitivos. La causa está en que no se conocía entonces casi la química de los coloides, y hoy, en cambio, se sigue con mucho más éxito esta orientación para la aclaración de casi todos estos hechos. Se ha demostrado, en efecto, para la mayoría de los cuerpos que producen las reacciones de inmunidad, su naturaleza coloidal, así, por ejemplo, debe citarse el hecho de que hasta ahora no se ha logrado que el organismo produzca ningún *anticuerpo* contra un *cristaloide*, siempre se necesita la presencia de algún coloide. *Los antígenos todos son, pues, coloides.*

El poder de difusión de la toxina diftérica, de la tetanolisina, así como de sus antitoxinas corresponde, según ARRHENIUS, al de un coloide de gran dispersión. BECHHOLD ha corroborado mediante la ultrafiltración tal afirmación. Las características de todos los antígenos y anticuerpos de ser influídos por iones, por el calor, por sacudidas mecánicas, por la vejez, etc., corresponden exactamente a caracteres coloidales de que se habla en el capítulo referente a variaciones en el estado coloidal.

La acción de precipitinas, aglutininas provocando precipitaciones y aglutinaciones de substancias, las lisinas en general, las uniones de toxina y antitoxina son fenómenos de gran semejanza con los que se estudian entre coloides. Para BORDET, GRUBBER, KRAUSS, etc., la acción de las dos primeras tienen tanto de reacción química, como de lo que en química coloidal llamamos floculación, coagulación, etcétera.

Respecto a las lísinas, como hemolisinas, bacteriolisinas, etc., cada día se tiende más a explicarlas por fenómenos coloidales, sobre todo desde los trabajos de LANDSTENIER que ha demostrado que las hemolisinas y bacteriolisinas del suero tienen gran relación con las substancias lipoídicas y que los puntos de su ataque contra bacterias, eritrocitos, etc., son sobre todo las porciones de éstos en composición semejante a las grasas. Cuerpos de composición sencilla, como jabones y ácidos grasos, tienen análogo valor hemo y bacteriolítico. También

ellos pierden su poder al calentarlos, o por vejez lo mismo que un complemento.

En muchas inmuno-reacciones se puede sustituir el complemento por lipodes o por albuminoides y LANDSTEINER ha podido reproducir artificialmente un modelo de inmuno-reacción, tomando como amboceptor una solución diluída de ácido silícico coloidal, y como complemento la lecitina, que es también coloide. Las relaciones de antígenos y anticuerpos, que como hemos dicho, sobre todo para los primeros, se trata siempre de substancias en estado coloidal, se rigen por leyes paralelas a las dadas para la adsorción. Y la cuestión de su especificidad se explica, como en la misma cuestión para los fermentos, teniendo en cuenta lo dicho para explicar la selección adsortiva, en la que cabe perfectamente la aceptación de la afinidad química.

Para BORDET, el fenómeno de la aglutinación de bacterias, por la acción de las aglutininas comprende dos fases, en la primera se une la bacteria a la aglutinina, en la segunda viene la aglutinación. Pues bien, él opina que la primera fase es una unión adsortiva de bacteria y aglutinina y en la segunda tal unión que se comporte como un coloide hidrófilo, se precipita por un fenómeno de coagulación corriente.

Es especialmente en este campo en donde podrían citarse innumerables ejemplos de las aportaciones con que la química coloidal ha contribuído para la explicación o para la enumeración de hipótesis aclaratorias de los hechos, pero parece que bastarán los citados para deducir su importancia (1).

Tensión superficial y adsorción en terapéutica

TRAUBE concedía a la primera una importancia grande para explicar la acción terapéutica de gran número de substancias e investigó un sinnúmero de medicamentos desde el punto de vista de su tensión superficial medida con el estalagmómetro de su invención, que es el que hemos descrito. Se trata de una equivocación y de una estimación exagerada del valor de tal propiedad, y estos estudios están hoy completamente abandonados. En cambio, es conocida la tendencia actual a presentar muchos medios terapéuticos en estado coloidal, plata, mercurio, sulfuro de calcio, etc., se basa esto en tres características de este estado, a saber: 1.° Tales preparados son en general, muy solubles; 2.°, con mucha frecuencia son innocuos, al paso que en estado molecular serían a veces muy venenosos; 3.°, presentan una superficie grandísima para la adsorción de las toxinas y de substancias perjudiciales de la sangre, respecto de las cuales poseen tendencia adsortiva. Por estas razones, su empleo está, por lo menos teóricamente

(1) El lector podrá encontrar cantidad considerable de detalles acerca de estos asuntos en los libros de: H. SCHADE, *Die Physicalische Chemie in der inneren Medizin*, editor Theodor Steinkopff, Dresden y Leipzig; en el de BECHHOLD, *Die Kolloide in Biologie und Medizin*, del mismo editor.

y en general, plenamente justificado como desinfectantes, lo mismo que en el tratamiento de ciertos envenenamientos agudos, en casos especiales de procesos infecciosos de estómago o intestinos, etc. El mismo salvarsán se presenta en solución acuosa al estado coloidal como demostró ya hace tiempo W. OSTWALD al ultramicroscopio.

Estos estados coloidales de los metales suelen obtenerse por medios eléctricos o por procedimientos químicos, y aun a veces por medios mecánicos como sucede cuando se trata de enriquecer el aceite de hígado de bacalao, en fósforo, en que se recurre al frotamiento mecánico de ambos (1).

Vitaminas y Físico-química

Desde que GOWLAND HOPKINS hace 20 años anunció ante la Sociedad de Farmacia de Londres el descubrimiento de las vitaminas, ha interesado cada día más el problema de su modo de acción. El descubrimiento de estas materias se sabe que fué debido a los experimentos realizados por aquel sabio, poniendo a prueba las antiguas concepciones sobre la nutrición de los animales. El encontró que cuando las proteínas, las grasas, los hidratos de carbono y las sales de la ración alimenticia estaban suficientemente purificadas no podían bastar al crecimiento ni al entretenimiento de ratas jóvenes. La adición a la ración de una muy pequeña cantidad de leche permitía a los animales crecer y prosperar. Existen, por lo tanto, ciertas substancias, además de las que antes se consideraban únicamente como esenciales, que son tan indispensables como éstas al organismo y que obran en cantidades pequeñísimas. A estas substancias las llamó años después C. FUNK *vitaminas*, y ABDERHALDEN *nutraminas*. Resumiendo en brevísimas palabras los resultados conseguidos en el estudio de este problema, diremos que se han hecho dos grandes grupos con ellas. Estos dos grupos fueron establecidos primeramente por razones prácticas, ya que se vió muy pronto que aquella acción favorable de la leche era debida, por lo menos, a dos factores; uno de ellos *soluble en las grasas* y que estaba contenido por lo tanto en la mantequilla de la leche, al paso que la otra substancia relativamente insoluble en las grasas pero *soluble en el agua* se hallaba en el suero. De aquí nació la división de *vitaminas solubles en las grasas* y *vitaminas solubles en el agua* mantenida hoy y justificada por los estudios bioquímicos posteriores.

Entre las primeras se sabe que están las llamadas vitaminas *A*, *D* y *E*. La *A* muy abundante en el aceite de hígado de bacalao, de acción favorable, sobre el crecimiento de los animales. La *D* posee acción antirraquítica, parece indispensable para la calcificación de los huesos en crecimiento y se halla también en aquel aceite. La ter-

(1) Poseemos en castellano una obra con numerosas fórmulas para la obtención de medicamentos en estado coloidal, titulada: *Medicamentos coloides*, por JOAQUÍN MAS Y GUINDAL. 1917.

cera, *E*, descubierta por EVANS juega un importante papel en el ciclo reproductor de los animales. Por ser las tres solubles en las grasas, nada de extraño tiene que se hallen normalmente en los compuestos lipoídicos de los tejidos, por eso, como hemos dicho, abundan las dos primeras en el aceite de hígado de bacalao y la *E* en el aceite extraído del embrión del grano del trigo candeal. Su conocimiento pasó desapercibido al principio porque los químicos y fisiólogos dedicaban su atención a la porción de las grasas neutras que es saponificable por las bases y despreciaron el resto, que en verdad es ínfimo, pues no llega en la mayoría de ellas al 1 % de su peso, pero que adquirió gran importancia al aprender que era esta parte la que podía encerrar las vitaminas citadas. A pesar de los numerosos estudios de que han sido objeto no se conoce su composición aunque parece ser que se trata de compuestos ternarios, por poder ser destiladas bajo presión reducida (2 mm.) a temperaturas vecinas de 200° C. Es importante el descubrimiento del sabio americano STEENBOCK, que encontró que una mezcla alimenticia insuficiente por faltarle la vitamina antirraquítica, y que por lo tanto produciría el raquitismo en el animal nutrido de ella, adquiría tal vitamina sometiéndola a los rayos ultravioleta de una lámpara de cuarzo de vapor, de mercurio. Se demostró que las radiaciones de corta longitud de onda provocaban la formación de tales substancias. Con esto dió la razón y unió las dos escuelas hasta entonces opuestas, de fisiólogos y médicos, que opinaban que el raquitismo dependía según los unos, sólo de defecto en el régimen alimenticio, al paso que los otros afirmaban que eran sobre todo las malas condiciones higiénicas y la falta de sol en especial, las engendradoras de aquel mal. Lo que hace el sol es provocar la formación de las vitaminas que pudieran faltar en los alimentos, sin más que exponer la superficie de la piel a la acción de sus rayos o a la de las radiaciones ultravioleta de otra procedencia.

Entre las *solubles en el agua* se hallan la *B*, llamada también *antiberibérica* y la *C* o factor *antiescorbútico*. La *B* se halla abundantemente en la levadura, que es donde se la busca para tratar de hallar su composición ; la segunda es buscada sobre todo en el jugo del limón.

Lo notable de todas ellas es la ínfima cantidad en que obran. Así, de la substancia purificada que encierra el factor *A* basta un 0,0006 % de la ración alimenticia de un animal, para mantenerlo sano. Del factor *E* han demostrado EVANS y BURR que bastan sólo 0,0005 gr. de la substancia extraída del trigo candeal que según ellos encierra tal factor, para que administrada a una hembra de rata previamente esterilizada por un régimen deficiente, conduzca a una recuperación completa de su fertilidad y del poder de criar a sus hijos. Para la *D*, las necesidades del organismo son del orden de 0,0001 gr. y respecto a la antiberibérica bastan sólo 0,00008 gr. al día y para la antiescorbútica 0,00045 gr. de los productos que las contienen, extraídos respectivamente como hemos dicho, de la levadura y del jugo de limón, respectivamente. Todas ellas obran por lo tanto en cantidades pequeñísimas, pues todavía esas cifras no se refieren a las vitaminas puras sino a las substancias que las contienen. ¿Cómo explicar su enérgica acción? Dejamos la palabra a J. C. DRUMMOND, profesor de Química biológica en « University College » de Londres, de cuya conferencia pronunciada el 10 de febrero de este año ante la *Royal Society of Arts*, tomamos estos datos. Dice así : « No se sabe todavía prácticamente nada del mecanismo por el cual las vitaminas liposolubles determinan los efectos que hemos notado sobre el organismo animal. En muchas cuestiones los progresos se realizan lentamente por la aplicación de la química física a los problemas biológicos. Estamos en tren de aprender cómo una fina capa de moléculas del espesor de una sola, puede modificar profundamente las propiedades de un tejido viviente. La formación de una tal película monomolecular de ácido láctico parece poner en marcha las transformaciones físico-químicas que condicionan la contracción muscular. El desplazamiento de cuerpos que normalmente reaccionan en la superficie de muy finos gránulos en la célula viviente, por la acción de una película monomolecular de un anestésico como el éter o de ciertos venenos, conduce a la imbibición de las oxidaciones celulares que denominamos narcosis. Las modificaciones de la estructura de la película molecular lipoídica de la superficie de los hematíes, cambian constantemente su permeabilidad y pueden provocar la salida de su contenido celular (hemolisis) y virtualmente la muerte de la célula. La ínfima cantidad de vitaminas liposubles que son fisiológicamente activas nos lleva a buscar en esta dirección la explicación de su acción. Esta vía parece deber conducirnos tarde o temprano a una explicación de los curiosos cambios de permeabilidad a las sales de calcio y a los fosfatos (las substancias necesarias a la formación de los huesos), que muestra el tubo digestivo de los mamíferos como consecuencia de los cambios en la cantidad de vitamina antirraquítica administrada. »

CAPÍTULO VII

Química coloidal de los albuminoides y de los lipoides

Algunas propiedades generales coloidales y químicas de los albuminoides, interesantes desde el punto de vista biológico

Los albuminoides y los lipoides son compuestos tan extendidos en los organismos que resulta oportuno estudiar particularmente sus propiedades coloidales, sin que esto quiera decir que vayamos a encontrar características ni propiedades nuevas del estado coloidal al tratar de ellos. Unicamente indicaremos, brevemente, en qué grado y de qué modo las cualidades generales de los coloides estudiadas en los capítulos anteriores, se presentan en estos compuestos químicos tan importantes en Biología.

Poseen casi todos ellos la notable propiedad de ser coloides « per se », pudiéramos decir. Son los *eucoloides* de W. OSTWALD, es decir, son substancias que sólo por el hecho de su enorme magnitud molecular, denunciada por su gran peso y por su complicada composición, poseen moléculas cuyo tamaño debe entrar ya en el territorio francamente coloidal. Esto significa que la dispersión molecular es en ellos al mismo tiempo coloidal. Un aumento en la dispersión traería consigo la disgregación molecular o sea la desaparición del compuesto como tal. Esto no quita para que al lado de micelas coloidales unimoleculares, haya otras mayores formadas por el agrupamiento de varias moléculas. Luego discutiremos más despacio estas ideas. Se desprende de tal concepción que no pudiendo manifestarse sus afinidades químicas más que estando la substancia en forma coloidal, nunca como en este caso será tan necesario estudiar juntas ambas cualidades. Debemos advertir que J. LOEB ha llegado a decir que no había diferencia entre química coloidal y química clásica, sobre todo en lo que se refiere a las materias albuminoideas. Estudiaremos primero los albuminoides y luego los lipoides, empezando por recordar brevemente los grupos en que se suelen dividir atendiendo a su composición química.

Con frecuencia se hacen dos grandes grupos, que son : *A*) el de las *Proteínas sencillas*, y *B*) el de los *Proteidos*. Comprende el *A*) : 1.°, el grupo de las *proteínas o albúminas verdaderas* ; 2.°, el de los *albuminoides propiamente dichos* o *albuminoides*, y 3.°, el de los *productos de transformación de los anteriores*. *B*) los proteidos encierran los *glico*, *núcleo* y *cromoproteidos*. Existiendo desde luego tránsitos entre estos grupos.

1.° *Proteínas verdaderas* o *albúminas*. Encierran substancias de diferentes propiedades físicas, así las *albúminas* como la *sero*, *lacto*, *ovoalbúmina* son solubles en agua pura. Las *globulinas*, como el fibrinógeno, *seroglobulinas* y otras, se disuelven sólo en soluciones salinas como cloruros alcalinos, etc., al $^1/_5$ o al $^1/_{10}$. Las *fosfoproteínas*, como *nucleoalbúminas*, *ovovitelina*, *caseína*, etc., necesitan para disolverse álcalis débiles. Suelen incluirse en este grupo las *protaminas* que son proteínas embrionarias de composición más sencilla (salmina, clupeína, esturina, etc.) y las *histonas*, que forman el tránsito de las anteriores a las albúminas.

2.° *Albuminoides propiamente dichos*, como la *keratina*, *elastina*, *colágena*, *reticulina*, *fibroína*, *sericina*, *espongina*, etc., no se disuelven en agua pura, ni en disoluciones salinas, ni en álcalis débiles. Forman parte de los esqueletos de diferentes animales. Al cocerlos en agua se descomponen algunos de ellos originando gelatina, soluble en agua caliente y que al enfriarse se gelatiniza o cuaja.

3.° *Productos de descomposición de los anteriores* : Son las *acidi* y *alcalialbúminas*, las *albumosas*, *peptonas*, *peptidos* y *aminoácidos*, que aparecen en la hidrólisis de las materias albuminoideas en general.

4.° *Proteidos* : Son uniones de proteínas con otros cuerpos de constitución complicada no albuminoideos y de muy diferente estructura denominados por KOSSEL grupos *prostéticos* que encierran con frecuencia Ph y S. Los proteidos pueden ser solubles e insolubles en agua, se disuelven no raramente en soluciones salinas y se parecen en algunas de sus propiedades a la caseína y a algunos albuminoides. Los *glicoproteidos* (*mucina*, etc.), los *núcleoproteidos*, y los *cromoproteidos* (hemoglobina, hemocianina, etc..), son los más conocidos (1).

Propiedades anfóteras de las substancias albuminoideas

Sabemos que las proteínas, albuminoides y la parte albuminoidea de los proteidos están constituídos por aminoácidos. Estos encierran el grupo carboxilo COOH, que es el grupo funcional de los ácidos orgánicos y el amínico NH_2, por eso se llaman *aminoácidos* (2). Su fórmula general llamando R al radical tan variable en ellos, será $R\langle^{NH_2}_{COOH}$. El poseer los dos grupos dichos hace que puedan comportarse como

(1) Para más detalles véase *Química Biológica*, de CARRACIDO.
(2) Véase Apéndice II al final de esta obra.

ácidos o como bases comunicando tal carácter a las substancias albuminoideas en general. Cuando reaccionan con bases queda libre el H del grupo carboxilo, siendo sustituído por el metal (Me) correspondiente y se forma agua $R\langle^{NH_2}_{COOH} + MeOH = R\langle^{NH_2}_{COOMe} + H_2O$.

Al reaccionar con ácidos quedan éstos con frecuencia engarzados en el grupo amínico $R\langle^{COOH}_{NH_2} + ClH = R\langle^{COOH}_{NH_3Cl}$ y si tenemos en cuenta que la disolución del aminoácido en agua consiste en realidad en la formación de un hidróxido $R\langle^{NH_2}_{COOH} + H_2O = R\langle^{NH_3OH}_{COOH}$, podremos escribir así las fórmulas finales de ellos en agua, y de ellos tras de la reacción con los ácidos y las bases :

$$R\langle^{NH_3OH}_{COOH} \quad + ClH = R\langle^{NH_3Cl}_{COOH} + H_2O$$

$$\qquad\qquad + NaOH = R\langle^{NH_3OH}_{COONa} + H_2O$$

A estos cuerpos que pueden obrar como ácidos o como bases se les denomina *anfóteros*. Al ser disueltos en el agua deben ionizarse, y las dos posibilidades de hacerlos según se hallan disueltos en solución básica o ácido serán

1.ª) $R\langle^{NH_3OH}_{COOH} = \left(R\langle^{\overset{+}{N}H_3}_{COOH}\right) + \overline{OH}$ | 2.ª) $R\langle^{NH_3OH}_{COOH} = \left(R\langle^{\overline{NH}_3OH}_{COO}\right) + \overset{+}{H}$

1.ª) Ionización originando reacción básica. 2.ª) Ionización originando reacción ácida y aun existe una tercera posibilidad con formación de tres iones: 3.ª) $R\langle^{NH_3OH}_{COOH} = \left(R\langle^{\overset{\pm}{N}H_3}_{COO}\right) + \overset{+}{H} + \overline{OH}$. Esto tiene un gran interés biológico, y sobre ello volveremos al hablar de los *reguladores* (Puffer) de la acidez o basicidad de los líquidos orgánicos, pues por la fórmulas dadas se explica que puedan conservar los líquidos orgánicos un grado de reacción constante, soltando H iones (tipo 2.°) si el líquido tendiese a hacerse demasiado básico, o produciendo iones OH (tipo 1.°) para neutralizar el exceso de cualquier ácido que se pudiese formar. Por eso, se dice que los líquidos orgánicos están muy bien regulados, o sea, que admiten la adición de cierta cantidad de ácidos o bases sin alteración de su punto de acidez, de basicidad o neutral.

Propiedades coloidales de las soluciones de albuminoides

Comenzaremos por los solubles en agua, o en soluciones salinas, como son la albúmina, globulina, hemoglobina, gelatina, etc. Algunos, como la albúmina de huevo y la hemoglobina, son fácilmente cristalizables y, por consiguiente, pueden obtenerse en estado de pureza. Son los más importantes para darse cuenta de la química coloidal del protoplasma.

Suele considerarse a las soluciones de estos coloides *hidrófilos* como intermediarios por sus propiedades entre las *moleculares* y las de los otros coloides o *hidrófobos* o suspensoides. Pero es que tratándose de los albuminoides se presenta esta cuestión muy interesante. **¿Son moleculares las soluciones coloidales de albuminoides?** Las soluciones de hemoglobina se consideran hoy como soluciones moleculares, ahora que de moléculas tan grandes que no pasan ya los poros de muchas membranas orgánicas, es decir, que no dializan. El peso molecular de la hemoglobina, averiguado por su presión osmótica, suponiendo que cada micela sea monomolecular, es de 15.849; averiguado refiriéndose al Fe suponiendo que cada molécula tenga sólo un átomo de Fe es de $16.666\left(^{C}758\,|\,^{H}1203\,|\,^{N}195\,|\,^{O}218\,|\,FeS_3\right)$. Y según el contenido en CO en el producto de la unión de éste con la hemoglobina es de 16.721. Teniendo en cuenta estos datos, que se pueden considerar como concordantes, y el del peso específico de la hemoglobina resulta que el diámetro de una molécula de ella es de 2,3 a 2,5 $\mu\mu$. Sabemos que el tamaño de las partículas coloidales de oro es de 1 a 1,5 $\mu\mu$, entran, pues, aquellas moléculas en el tamaño coloidal.

Respecto a las soluciones de albúmina diremos que Sorensen ha calculado su peso molecular, por consideraciones parecidas a las anteriores y le asigna el valor de 34.000. La creencia general es que existen en sus soluciones además de las micelas monomoleculares, otras que son agregados de ellas, pues en las soluciones de albúmina se pueden apreciar variaciones en el grado de su dispersión. Así, Lillie encontró que se podría disminuir la presión osmótica de la albúmina añadiendo a sus soluciones neutras, sales, influyendo tanto los aniones como los cationes. La serie de los aniones según este criterio es la siguiente : SO_4, Cl, NO_3, Br, I, CNS, que es la misma que Hoffmeister y Pauli encontraron al estudiar el poder precipitante de las sales sobre las soluciones de albúmina. Como esta precipitación o coagulación es una disminución del grado de dispersión, se puede presumir que la disminución de la presión osmótica cuyos agentes, como acabamos de decir, coinciden con los provocadores de aquélla, será también producida por una disminución en el grado de dispersión, o sea por el aumento en el número de moléculas de cada micela. Loeb, sin embargo, cree que la disminución de la presión osmótica de las soluciones de albúmina por la acción de sales tiene otra explicación. El cree que las citadas experiencias de Lillie, y en general las que se basan en

el estudio de la presión osmótica de los albuminoides, adolecen del defecto de no haber tenido en cuenta el equilibrio de DONNAN (1) al que él concede gran importancia. Sabemos que cuando una membrana separa dos soluciones de electrólitos, y esta membrana es impermeable para algunos de los iones y no lo es para los demás, entonces, según DONNAN, deben aparecer en el lado de la membrana donde están los iones para los que es impermeable, una presión osmótica suplementaria y un potencial eléctrico aunque los otros pasen fácilmente. Si colocamos, por ejemplo, en un saco de colodión una disolución de albúmina clorada, es decir, una combinación de albúmina y de ClH, e introducimos el saco en una disolución diluída de ClH, veremos que evidentemente se habrán disociado electrolíticamente ambas soluciones ; fuera habrá iones Cl y iones H ; dentro iones Cl y H y iones de albúmina. Todos pasan a través de la membrana menos los de albúmina, por su tamaño. El equilibrio, según DONNAN; se establece cuando la suma de los iones en el saco sea mayor que los de fuera (esto es claro, pues los iones Cl y H libres, por decirlo así, de dentro tienen que ser en menor número que los de fuera, pero es que la albúmina que no puede pasar retiene en cambio cierto número de iones Cl, por eso éstos, en total, son más que los de fuera). Así que si añadimos ClH a una solución de albúmina cuya presión osmótica habíamos medido encontraremos al medirla nuevamente que habrá aumentado, porque en efecto hay allí más iones, lo mismo sucede al añadir una base. Pero si entonces se añade una sal siendo ya ácida la solución de albúmina, como la sal disminuye la disociación electrolítica, sobre todo si es del mismo ácido que existía en la solución, disminuyendo los iones disminuirá la presión. También disminuyen las sales, la presión osmótica de soluciones alcalinas de albúmina por la misma razón ; en este caso tendrán más importancia las valencias de los cationes, en el caso anterior las de los aniones.

Fijémonos, sin embargo, que LOEB trabajó y habla sólo de soluciones ácidas o alcalinas de albúmina y, en cambio, LILLIE de soluciones neutras; puede suceder, por lo tanto, que ambas concepciones conserven su valor cada cual en su caso.

LOEB insiste (2), a pesar de todo, en que las soluciones de albúmina son moleculares partiendo del hecho de que los ácidos provocan insignificantes cambios en su viscosidad, y dice : si las micelas fuesen plurimoleculares, es decir, como saquitos de moléculas, al añadir un ácido sea el ClH a la solución, se establecería como en el ejemplo antes citado un equilibrio de DONNAN, con el conocido aumento de presión osmótica dentro de los saquitos micelares respecto al líquido exterior, lo cual se traduciría en un aumento del volumen de aquéllos y por lo tanto de la viscosidad de la disolución ; al no suceder esto es que no hay tales saquitos sino que cada micela es una molécula. También admite la dispersión molecular para las soluciones coloidales calientes de gelatina.

(1) Véase « Equilibrio de DONNAN », en el capítulo sobre Ósmosis.

(2) El lector que desee ampliar sobre estas interesantes ideas de LOEB puede recurrir a su libro *Die Eiweisskörper und die Theorie der Kolloidalen Erscheinungen*, por JACQUES LOEB. Julius Springer, editor, 1924. Recomendamos esta traducción alemana prefiriéndola al original inglés, porque aquélla apareció un año después que éste y como el mismo LOEB indica en el prólogo de la edición alemana, para hacer la última modificó y amplió notablemente el original inglés. J. LOEB murió antes de ver aparecer la edición alemana. Existe también una edición francesa en dos tomos, por MOUTON. París, Alcau editor.

De esta divergencia de opiniones parece deducirse y ésta es la creencia más generalizada, que las soluciones de los albuminoides encierran probablemente gran cantidad de micelas monomoleculares, pero que debe haberlas también formadas por la reunión de varias moléculas.

Consideraciones sobre el hinchamiento por imbibición de algunos albuminoides

Sabemos que este hinchamiento es para la gelatina mayor, cuando se la introduce en una solución a la que añadimos un ácido o una base. Lo cual, según PROCTER y WILSON y conforme con las ideas antes expuestas de LOEB, debe obedecer a que según el equilibrio de DONNAN se establecería dentro de la gelatina una presión osmótica extra, debida a la formación en su interior de iones en mayor número que en el exterior. Esta presión en exceso produciría su aumento de volumen.

Vamos a poner un ejemplo práctico para aclarar esta idea. PROCTER colocó un trozo de gelatina clorada en una disolución acuosa de ClH y esperó a que se estableciese el equilibrio en el cambio mutuo de substancias, entre ambos medios. Analizó entonces cuidadosamente ambos y observó que la gelatina encerraba ClH libre en su interior y además cloruro de gelatina; en el líquido exterior sólo había ClH disuelto en el agua. La concentración relativa del ClH libre dentro y fuera de la gelatina venía expresada, conforme a la teoría del equilibrio de DONNAN así :

$$x^2 = y\ (y + z)$$

en donde x es la concentración de los iones H y de los Cl en el líquido exterior ; y es la concentración de los iones H y Cl del ácido clorhídrico libre dentro de la gelatina ; z es la concentración de los iones Cl unidos al catión coloidal gelatina. Esta fórmula no viene a decir más que los productos de las concentraciones de los dos iones difusibles de carga eléctrica contraria en ambos medios son iguales entre sí. Notemos que x é y pueden ser conocidos mediante el análisis inmediato y z será entonces conocido mediante la fórmula anterior. Llamemos a la gelatina (1) y al líquido exterior (2) y supongamos que hemos encontrado que $x = 4$, o sea que en el líquido exterior hay 4 mol. de ClH, es decir, 4 Cl y 4 H ; y que $y = 2$, ó sea, que impregnando la gelatina hay 2 mol. de ClH libre, es decir 2 Cl + 2 H. Tendremos $4^2 = 2\ (2 + z)$ ó $16 = 4 + 2z$. Luego $z = \frac{16 - 4}{2} = 6$. Habrá por lo

tanto 6 Cl unidos al catión gelatina. Resumiendo : en (2), líquido exterior, habrá 4 Cl y 4 H en forma de ClH libre ; en (1) gelatina, habrá 2 ClH libre y 6 Cl unidos a aquélla. Se realizan aquí las siguientes condiciones : 1.ª Los productos de los iones difusibles a cada lado de la membrana son iguales (aquí la misma gelatina hace de membrana, pero en general este experimento se hace, echando la gelatina clorada caliente y flúida en un saquito de colodión dejando enfriar el todo y sumergiéndolo luego en el agua acidulada). E. E.

$$\text{En (2) hay } 4\ Cl \times 4\ H = 16$$
$$\text{En (1) hay } 8\ Cl \times 2\ H = 16$$

2.ª Las concentraciones respectivas de ambos iones en (2) y en (1) son estas

$$[4\ H]_2 > [2\ H]_1 \qquad \text{y} \qquad [4\ Cl]_2 < [8\ Cl]_1$$

3.ª La acidez de la gelatina será menor que la del líquido exterior, puesto que en (2) hay 4 iones H y en (1) sólo hay 2 y esto es forzoso dada la ecuación anterior.

4.ª El número de iones difusibles existentes a cada lado de la membrana es desigual E. E.

$$\text{En (2) hay } 4\ Cl + 4\ H = 8 \text{ iones}$$
$$\text{En (1) hay } 8\ Cl + 2\ H = 10 \text{ iones}$$

Esta última circunstancia es muy interesante, pues como decíamos al principio, por haber *más iones difusibles en la gelatina, aumentará la presión osmótica de ésta*, la cual al ser hipertónica atraerá el agua de fuera, *se hinchará* (Quellung), hasta que esta tendencia se halle equilibrada por la de la cohesión entre las partículas coloidales de la gelatina que se opondrá al hinchamiento.

Pero, además, según la teoría de Einstein sobre la viscosidad, ésta debe aumentar al aumentar el hinchamiento. Para Loeb por lo tanto estas dos cualidades tan características de los coloides se explican, por lo menos para los albuminoides, cuantitativamente por la teoría de Donnan ; y teniendo en cuenta ésta, las leyes de la química clásica como las de las proporciones constantes y múltiples, son perfectamente aplicables para explicar las relaciones entre los albuminoides y otros iones cualesquiera, lo mismo que nos sirven para explicar las reacciones entre cristaloides entre sí. La ley que en el capítulo VI denominábamos de la *Adsorción isoterma* de Freundlich, como cualidad separatoria de los sistemas de dispersión grosera y coloidal por un lado, y los de dispersión molecular por otro, no tendría razón de ser para los albuminoides. Las uniones y relaciones de éstos con otros compuestos se realizarían obedeciendo a las leyes stochiométricas de la química clásica y por lo tanto desaparecería, por lo menos para los albuminoides la distinción que hoy se hace entre química coloidal y química clásica o de moléculas y iones. Su

libro, como él lo indica, no tiene más fin que aportar experiencias demostrativas de tal aserto.

La serie de iones de Hoffmeister, ordenados según su poder, respecto del hinchamiento por imbibición de la gelatina, es como sigue : citrato, sulfato, acetato, nitrato, bromuros, yoduros, sulfocianuros. Los tres primeros disminuyen su imbibición en agua respecto del efecto producido por ésta pura ; los demás la aumentan en agua y la disminuyen en ácidos diluídos. Tal es la serie admitida para este fenómeno por Hoffmeister, Pauli, Spiro, W. Ostwald y Fischer. Pero Loeb indicó que respecto a la imbibición de la gelatina en soluciones ácidas, obran frenando sólo los aniones, y para las soluciones básicas sólo los cationes de las sales. Y que en ambos casos no tenía influencia la naturaleza química de ambos, sino sus valencias. Así, los trivalentes frenan más que los bi, y éstos más que los monovalentes. Y segun él, todos ejercen su acción disminuyendo la disociación de la combinación de la gelatina con los ácidos o las bases, y haciendo descender, por consiguiente, la presión interna extra de aquélla. Las sales obrarían, por lo tanto, modificando primero la concentración de los iones H y OH, y esta modificación alteraría luego la disociación citada. Según Loeb los autores anteriores no tuvieron en cuenta la gran influencia de esta concentración de los iones H y OH, y por eso sus resultados diferían algo de los que él mismo obtuvo.

Las globulinas en agua pura no se disuelven, y en cambio son solubles en soluciones salinas. Según Hardy esto es debido a la formación de complejos solubles de ellas con la sal, como sucede con otros productos orgánicos. Tales uniones con el agua se descomponen y precipitan, en cambio si se diluyen aquellas disoluciones en solución fisiológica de ClNa entonces no se descomponen ni precipitan, no aparecen en el líquido ultramicrones.

Propiedades eléctricas de las soluciones de albuminoides

La carga eléctrica de estas soluciones coloidales hidrófilas es, en general, muy pequeña, por eso en ellas la repulsión de las micelas entre sí no es grande, y no bastaría para explicar, el mantenimiento en separación de unas y otras en la solución, como sucede en los suspensoides, aquí más bien tal separación se debe a la atracción entre el agua y las micelas.

En la mayoría de los casos la carga de las partículas coloidales de los albuminoides es negativa, por eso en la cataforesis caminan lentamente hacia el ánodo. Para llegar al punto *isoeléctrico*, es decir, al punto en que por hallarse descargadas, se traduce por su inmovilidad en la cataforesis (y generalmente en los coloides hidrófobos o suspensoides por su precipitación), es necesario acidificar sus soluciones un poco. Así que sabiendo que, según Sorensen, el punto neutro de una solución posee (1) una concentración de iones H expresada por

(1) Véase capítulo « Concentraciones de iones H ».

ph = 7,07, a 18°, comprenderemos que la albúmina de huevo tenga su punto isoeléctrico cuando *ph* = 4,8, la seroglobulina cuando *ph* = 4,4, la oxihemoglobina, gelatina y caseína cuando *ph* = 4,7. Si añadiésemos más ácido pasan del punto isoeléctrico y se cargan positivamente, caminando entonces lentamente hacia el cátodo en la cataforesis.

Explicación química de esta variación en la carga eléctrica de las micelas, sin recurrir a la adsorción de iones

Hemos dicho al empezar que los albuminoides son electrólitos anfóteros, es decir, que emiten en el líquido en que están disueltos, según sea el grado de acidez o basicidad de éste, iones H o OH. Sabemos que según la ley de la disociación química denominada *constante de disociación*, la relación entre el producto de los iones formados al disociarse un electrólito, con las moléculas no disociadas de éste es constante ; como al disociarse los albuminoides en el agua lo hacen según los esquemas dados al comienzo del capítulo II, podremos escribir (1) :

$$\frac{(\overset{+}{H}) \times (NH_3\overline{OH}-R-COO)}{(NH_3OH-R-\overline{COOH})} = K_1 \text{ y } \frac{(\overline{OH}) \times (NH_3-R-\overset{-}{\overset{+}{C}}OOH)}{(NH_3OH-R-COOH)} = K_2.$$

El que en soluciones neutras como hemos dicho, las micelas sean negativas, se debe a que K_1, es mayor que K_2, es decir, a que predomina el tipo 1.° de disociación en el que los iones complejos de albúmina son, como se ve, negativos ; y también por lo mismo sus soluciones se deben considerar como ácidos ya que predominan los iones H sobre los OH. Al pasar la corriente por estas soluciones, habrá dos emigraciones de albúmina, los $NH_3\overset{+}{} - R - COOH$ van hacia el cátodo y los $NH_3OH - \overline{R} - COO$ hacia el ánodo. Siendo éstos más abundantes (casi exclusivos), por eso es la que advertimos. Al mismo tiempo, como es lógico, caminan los iones $\overset{+}{H}$ hacia el cátodo y se desprenden, aunque débilmente iones $\overline{OH}$ en el ánodo. Todo ello es, sin embargo, poco intenso porque los albuminoides en soluciones neutras se disocian electrolíticamente con poca intensidad.

Supongamos ahora que a tal solución neutra le añadimos un ácido enérgico diluído como el ClH, éste se disociará con formación de iones H y con esto la disociación del tipo 1.° tendrá que disminuir mucho, pues debiendo ser K_1 constante, al aumentar los iones $\overset{+}{H}$, por la adición del ácido tendrá que disminuir $NH_3\overline{OH} - R - COO$. En cambio, respecto a la disociación del tipo 2.° ocurrirá que los iones H, allí añadidos, neutralizan muchos de los OH existentes y debiendo ser K_2 constante no tiene más remedio que producirse nue-

(1) Los paréntesis ( ) indican concentración de lo contenido en ellos.

vamente otros OH y, por lo tanto, otros $NH_3 - \overset{+}{R} - COOH$. Estos cationes complejos de albúmina se unen en parte con los aniones del ClH, es decir, con los $\overline{Cl}$ para formar la sal ($NH_3\,Cl - R - COOH$), pero en su mayoría permanecen libres en la solución, porque la disociación electrolítica de los albuminoides en este caso es muy grande. El resultado es que aumentarán en la solución los iones $NH_3-\overset{+}{R}-COOH$, y según el ClH que añadamos, estos iones + serán primero en menor, luego en igual y al fin en mayor número que los aniones ($NH_3\overline{OH} - R - COO$). Cuando los dos están en igual cantidad se habrá alcanzado el punto isoeléctrico, pues las dos emigraciones se anulan al contrarrestarse con igual intensidad, y si se pasa de ahí y aumentan ahora los cationes, entonces la emigración será más fuerte hacia el cátodo, habiéndose así invertido el sentido de la emigración primitiva. Como vemos, no hay que hacer intervenir aquí, para explicar el cambio de carga eléctrica de las micelas a la adsorción de iones de signo contrario, como sucede en general para otros coloides.

Sobre la coagulación de los albuminoides

Ya dijimos, al hablar de la coagulación en general, la notable diferencia que respecto a la sensibilidad, por decirlo así, frente al poder coagulante de los electrólitos, presentaban los coloides hidrófobos (metales coloidales, etc.), que son muy sensibles a su acción, y los hidrófilos albuminoides que no se coagulan por este motivo con tanta facilidad. A los últimos, sólo soluciones concentradas de ClH, por ejemplo, les hace coagular. Ejercen también acción coagulante el alcohol, la acetona, etc. Pero, en cambio, a temperaturas elevadas muchos albuminoides solubles en agua o en soluciones salinas, se coagulan por la acción de pequeñas cantidades de electrólitos, semejándose entonces a los coloides hidrófobos o liófobos. Vemos, pues, que tenemos que estudiar dos modos diferentes de coagulación, la producida tras el calentamiento de sus soluciones, mal llamada *coagulación por el calor*, y la provocada a la temperatura ordinaria *por la acción de las sales*. En realidad, las dos obedecen a la misma causa, es decir, a la acción de electrólitos, como lo prueba el hecho de que una disolución de ovoalbúmina libre de sales por la diálisis *no llega a coagularse por la acción del calor*. Pero basta en este momento, es decir, cuando está cociendo, por ejemplo, o después de enfriada, añadir algún electrólito, aun en pequeña cantidad, para provocar su inmediata coagulación. Vamos a ver qué es lo que se cree sucede en ambos casos :

Coagulación llamada por el calor o sea de los albuminoides desnaturalizados

HARDY fué el primero que ya desde 1899, indicó que en este proceso debe haber dos fases. El decía que al calentar los albuminoides,

primero debe tener lugar su *desnaturalización*, y luego en un segundo tiempo viene su *aglutinación* o *coagulación*. La desnaturalización de los albuminoides se cree que consiste en una verdadera reacción química entre ellos y el agua, y en vista de la influencia que los ácidos, bases y sales ejercen sobre la velocidad de la desnaturalización, se ha deducido que se debe de tratar de una hidrólisis débil de los albuminoides. Sabemos que la inversión del azúcar en agua es acelerada por la adición de ácidos diluídos, admitiéndose que son los H iones de éstos los que ejercen la acción catalizadora. También las sales coadyuvan a esta acción catalítica, habiéndose visto que según tal influencia podemos formar una serie como ésta : SCN, Cl, SO_4 considerando sólo los aniones. Pues bien; tal es la serie que nos resultaría estudiando su influencia sobre la desnaturalización. Concentraciones grandes de sales, por frenar la disociación de los ácidos debilitan la hidrólisis. Las bases, si están poco concentradas, disminuyen con sus OH el número de iones H neutralizándolos, y frenan, por lo tanto, la hidrólisis. Pero cuando están en mayores concentraciones, esta acción frenadora se halla compensada en el caso de los albuminoides, por otra aceleradora, que consiste en la formación de sales de ellos con los álcalis (alcalialbúminas), las cuales se ionizan fácilmente y en este estado reaccionan con el agua mucho más ávidamente que los albuminoides puros poco ionizados. Por eso a tales concentraciones vuelven a favorecer la hidrólisis de éstos. Los ácidos también se unen a los albuminoides en la misma forma, por eso favorecen su desnaturalización doblemente, a saber, por la acción de los H iones que poseen, y por el aumento de la ionización de las acidoalbúminas respecto a las naturales.

El calor favorece la desnaturalización muchísimo, así Lepeschkin dice que a 63° C. se desnaturaliza una disolución filtrada de ovoalbúmina en 40 segundos y a 56° necesita seis horas. Pero este coeficiente de temperatura varía mucho con la substancia albuminoidea de que se trate.

Sea cualquiera el proceso de desnaturalización, tras ella se comportan los albuminoides como coloides hidrófobos, así : según el mismo Lepeschkin, una solución natural de albúmina necesita para coagularse la adición de dos moléculas de $SO_4(NH_4)_2$ por litro. Tras su desnaturalización basta una concentración de 0,05 mol. gr. por litro.

La albúmina desnaturalizada se combina con ácidos y álcalis, como la natural, variando mucho el coeficiente de temperatura de su coagulación, siendo el de las combinaciones con los ácidos pequeño y el de las con los álcalis grande.

Coagulación de los albuminoides naturales o sea sin intervención del calor

Los naturales necesitan para coagularse concentraciones de sales mucho mayores que los desnaturalizados ; la capa de agua que

los rodea (hidrófilos) impide la adsorción de los iones que produce la variación eléctrica causa de la coagulación. Sería preciso primero librarles de esa cubierta acuosa, lo cual se consigue mediante el empleo de grandes concentraciones de sales. La afinidad de éstas para con el agua vence la de las micelas albuminoideas para la misma y quedan éstas despojadas de su cubierta acuosa. Entonces viene en seguida su unión recíproca y su precipitación. Si el precipitado se recoge y se lava abundantemente con agua, se puede lograr restablecer la cubierta hídrica alrededor de cada micela y conseguir su dispersión y, por fin, su disolución nuevamente (peptización). Tal coagulación, por lo tanto, es reversible.

En soluciones neutras o alcalinas la serie de aniones respecto a su acción deshidratante es: citratos > tartratos > sulfatos > acetatos > cloruros > nitratos > yoduros > sulfocianuros. Es la tantas veces citada serie de Hoffmeister idéntica a la formada al estudiar la acción de las sales sobre el hinchamiento por imbibición, etc. La serie se invierte si la solución de albúmina la hiciésemos o fuese ya ácida. No está todavía explicada la causa de esta desigual acción de los iones en la coagulación reversible de los albuminoides. La serie citada se llama también lyotropa o hidrotropa.

Los cationes Ca, Ba, Sr. bivalentes producen la coagulación de los albuminoides naturales, pero también en concentraciones elevadas de sus sales. Pero en este caso los precipitados son muy insolubles en el agua, debido a su acción desnaturalizante.

Las sales de los metales pesados Hg. Pb. Zn. Cu, etc., se comportan de modo muy diferente, porque forman con los albuminoides uniones a modo de sales con un carácter muy marcado. Y dado el enorme peso molecular de la albúmina se comprende que muy pequeñas cantidades de las sales de los citados metales pesados basten para provocar la coagulación de los albuminoides. El precipitado formado es insoluble en el agua, pero es sobuble en exceso de reactivo, y en sales alcalinas, etc., lo cual indica que la albúmina de la unión salina no está desnaturalizada. Quizá se formen con exceso de reactivo sales dobles solubles e hidrófilas, pues estas soluciones pueden ser de nuevo coaguladas por la acción del $SO_4(HN_4)_2$ en fuertes concentraciones. Las sales de los albuminoides con los metales pesados reaccionan fácilmente con el agua, y por eso se desnaturalizan con facilidad. Así basta añadir 0,0001 mol. de sublimado a un litro de solución de albúmina para acelerar su desnaturalización 40 veces.

Los líquidos orgánicos miscibles y hasta substancias sólidas mezcladas con el agua, provocan también la coagulación de los cuerpos de que tratamos. Así, entre otros, el alcohol, acetona, hidrato de cloral, son coagulantes, pero sólo en presencia de sales, pues aquéllos obran sólo desposeyendo a las micelas albuminoideas de la capita acuosa que las rodea, y entonces habiendo adquirido las propiedades de hidrófobos viene la acción coagulante de los iones. Así, si por diálisis quitamos las sales de una solución de albúmina, y luego añadimos

alcohol, nada sucede, pero basta añadir entonces una pequeña cantidad de sal para producir el precipitado. Obran, por lo tanto, el alcohol, etcétera, como las sales alcalinas en grandes concentraciones, por su acción deshidratante. Pero las substancias orgánicas se diferencian de las sales minerales en su acción sobre los albuminoides en que aquéllas obran también desnaturalizando éstos al cabo de cierto tiempo, por eso la precipitación producida por ellas sólo es reversible al principio. Tal desnaturalización es debida a que el alcohol, acetona, etc., aceleran la reacción entre el agua y la albúmina o sea la hidrólisis de la última.

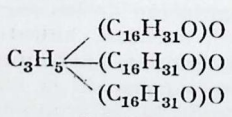
Si los líquidos orgánicos que añadimos no fueran miscibles con el agua, si utilizásemos el éter, cloroformo, benzol, por ejemplo, para mezclarlos con soluciones concentradas de albúmina, observaremos al cabo de unas horas que se forma en el límite de separación de ambos líquidos una pielecita sólida de albúmina, la cual se forma a causa de la fuerte adsorción, es decir, de la condensación en la superficie límite de las micelas albuminoideas. Si agitamos el éter, cloroformo, etc., con soluciones de albúmina, las gotitas de aquellos líquidos que se forman, condensarán a su alrededor como en el caso anterior la albúmina y con tal aumento de concentración, se apreciará mucho la desnaturalización de ésta. Así la desnaturalización de la ovoalbúmina de gallina agitada con cloroformo, tiene lugar casi instantáneamente a 55°, mientras que la misma sin cloroformo necesita al menos doce horas para ser desnaturalizada a 55° centígrados.

Sobre química coloidal de lipoides

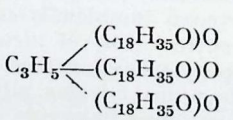
Se denominan lipoides en general las substancias existentes en los organismos que poseen el carácter de ser solubles en el éter, benzol, cloroformo, aceite y parte en alcohol, pero que son insolubles al menos molecularmente, en agua.

Como se ve, estos son caracteres de las grasas en general, y en efecto, el nombre Lipoide no quiere decir otra cosa que « semejante a grasa ».

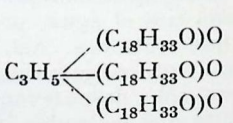
Químicamente encierran cuerpos de diferente composición, por de pronto se incluye en ellos a las *grasas neutras*, es decir, a las combinaciones del triol, glicerina $C_3H_5(OH)_3$, con los ácidos grasos esteárico, palmítico, margárico, oleico, etc., engendrando la palmitina, estearina, etc.



Palmitina



Estearina



Oleína

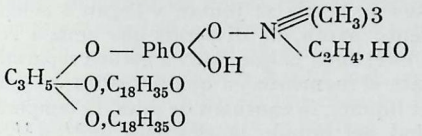
y las combinaciones de éstos, como la estearipalmitina, etc. Por hidrólisis se descomponen en el alcohol glicérico y en los ácidos que lo eterifican, por ejemplo :

$$C_3H_5O_3(C_{16}H_{31}O)_3 + 3\,H_2O = C_3H_5(HO)_3 + 3\,C_{16}H_{32}O_3$$

Palmitina — Agua — Glicerina — Acido palmitico

En los lipoides se incluyen también los éteres existentes en los organismos, del alcohol monoatómico, la *colesterina* $C_{16}H_{44}O$, que por su aspecto son muy parecidas a las grasas. Es digno de mención entre ellos la *lanolina* que se extrae de la lana, principalmente de los rumiantes.

Debemos citar como lipoides interesantes, desde el punto de vista biológico, a las *fosfátidas* en general o *lecitinas* que son éteres de la glicerina formados por ácidos grasos y por el fosfórico en combinación con la base $HO-N\equiv(CH_3)3$ C_2H_4, HO denominada *colina* resultando compuesto de la siguiente estructura:



Lecitina diesteárica

Consideraciones sobre las emulsiones de los lipoides con el agua y acción sobre ellas de aniones y cationes

Los lipoides forman con el agua, en ciertas condiciones, emulsiones cuyas partículas, en parte, pueden llegar al tamaño de ultramicrones, es decir, a formar soluciones de *coloides emulsoides*. Parece ser que éstos son liófobos o hidrófobos, si se tiene en cuenta que son coagulables por pequeñas cantidades de electrólitos. Las soluciones de lecitina presentan cualidades intermedias entre las hidrófobas y las hidrófilas ; y las soluciones de grasas en forma de jabones, son marcadamente hidrófilas. Los aceites no forman emulsiones estables en agua a no ser que añadamos álcalis, bases, albuminoides, polisacáridos, etc. Estas substancias actúan disminuyendo fuertemente la tensión superficial en el límite de la fase aceite-agua, con lo cual se disminuye la tendencia de las gotitas a reunirse en otras mayores. También se atribuye esta propiedad protectora de tales cuerpos a la formación de capitas de adsorción de los mismos alrededor de las micelas lipoidicas. Pero esto no es seguro en todos los casos, Lo más probable, sin embargo, es que la referida acción protectora, sea en todo análoga a la que hemos dicho que realizaba la gelatina sobre soluciones de suspensoides (plata coloidal, etc.) (1), es decir, que sea debida a que

(1) Véase Coloides protectores (Schutzwirkung).

los coloides hidrófilos que añadimos (albúminas, polisacáridos, etc.), o los que se forman al añadir los álcalis (sabemos que los álcalis con el aceite u otras grasas forma jabones que son liófilos), envuelven a las gotitas en una capa ávida de agua, y transformen las partículas liófobas de aceite en liófilas, haciéndolas más estables. Esta es la explicación de la emulsión de las grasas en nuestro intestino por la acción de las sales biliares.

Es conveniente tener en cuenta que la emulsión puede ser de dos clases, a saber: de aceite en agua o de agua en aceite; en el primer caso el agua será la fase dispersante y el aceite la dispersa, y en el segundo, lo contrario. Las emulsiones del tipo primero las obtendremos añadiendo aceite al agua, si, por el contrario, añadimos agua al aceite obtendremos las del tipo segundo. En cualquiera de los dos casos, aumentando la dosis de lo menor, se llegará a un estado en que las fases se acumulen. Así, si añadimos, poco a poco, aceite a una emulsión de aceite en agua y agitamos al mismo tiempo, observaremos que aumenta la viscosidad de la emulsión, hasta que en un momento dado las gotitas de aceite se juntan y llegan a soldarse totalmente. En este momento pasan, de dispersas que eran, a constituir la fase dispersante, y es el agua la que está en gotitas separadas por el aceite; es muy diferente el momento en que se realiza este cambio, según la alcalinidad del líquido, la cantidad de sales, la temperatura, etc.; así, si la alcalinidad del líquido la elevamos de $^1/_4$ a $^1/_2$ de N, NaOH, el cambio se realizará con la unidad de cantidad de aceite. El Cl_2Ca también favorece el mismo cambio, etc.

Las emulsiones más estables se obtienen añadiendo soluciones de aceite en alcohol o acetona al agua, en este caso las gotitas de aceite están cargadas negativamente, y se repelen mutuamente como las micelas de los coloides hidrófobos. Si añadimos electrólitos conseguiremos disminuir su potencial y, por lo tanto, su repulsión, llegando un momento al hacerse ésta nula en que se reúnen aquéllas, coagulándose la solución; esto sucede ya con un potencial aproximado de 0,03 volt. Los aniones trivalentes son los que actúan más enérgicamente, luego los bi y luego los monovalentes.

Podemos obtener emulsiones de lecitina y colesterina echando sus disoluciones etéreas en agua (procedimiento por condensación), pero las de la primera se forman también por dispersión espontánea de ella en agua. En este caso la tensión superficial en el límite de ambas es muy pequeña, y si añadimos entonces albúmina, aquélla se hace, por decirlo así, negativa, es decir, se observa una tendencia de la lecitina a dispersarse en el agua, adquiriendo al principio aspectos algo extraños (mielínicos), luego se resuelve en gotitas, cuya formación puede seguirse muy bien al microscopio. Tal propiedad de la lecitina de emulsionarse de por sí en el agua la acerca a los coloides hidrófilos, siendo los caracteres de sus soluciones intermedios entre las de éstos y las de los hidrófobos. Necesitan como las de aquéllos, para ser coaguladas de la adición de grandes concentraciones de sales

alcalinas, aun cuando al pasar de cierto límite pierden éstas su acción coagulante. Para la sal común, el óptimo de su poder coagulante está en la concentración correspondiente a la solución normal; las que son $^1/_2$ *n* ó cinco veces N no coagulan ya la lecitina. Las sales de los metales bivalentes son más coagulantes, así el Cl_2Ca, $SrCl_2$ y $BaCl_2$ actúan como precipitadoras en concentración de $^1/_{100}$ mol. por litro. En este aspecto son muy pronunciadas las propiedades químicas específicas de los cationes, así el sulfato alumínico no precipita la lecitina, en cambio el sulfato de hierro la coagula en concentraciones de 1*n* hasta $^1/_{2000}$ *n*. Las sales de los metales pesados la precipitan en parte, así el Cl_2Zn lo hace en concentraciones de 1, $^1/_5$ y $^1/_{100}$ mol. en litro, mientras que a $^1/_{120}$ mol. no tiene acción ninguna; las sales de mercurio no tienen acción coagulante sobre aquélla.

Por otra parte, la debilidad de las propiedades hidrófilas de las soluciones de lecitina aparece al observar que en ella encontramos otra vez como coagulante la conocida serie liotropa de aniones: SO_4, acetato, Cl, NO_3, Br, I, S C N.

Las soluciones coloidales de colesterina se parecen en cuanto a su manera de comportarse frente a los electrólitos a las de lecitina. Pero se diferencian en detalles; así, el alumbre de aluminio precipita la colesterina ya a una concentración de 0,0001 mol. en litro y el cloruro de hierro a 0,002 mol. por litro. El mercurio no las coagula en absoluto lo mismo que hemos dicho para la lecitina.

Aplicaciones biológicas de estos hechos

Es el estudio de la química coloidal de los albuminoides el que probablemente nos acerca más al conocimiento físico-químico del protoplasma; pero como en otro capítulo se habla ya algo de esta cuestión, vamos a pasar a otra, de gran interés biológico y médico, que es objeto hoy de estudio intenso por parte de numerosos investigadores; nos referimos al problema de la *permeabilidad de la membrana celular*, como reguladora de los cambios entre la célula y su medio (1). Tratamos aquí de ello, porque una de las teorías que han gozado en este asunto de más nombre es la

Teoría de la membrana lipoide de Overton

Antes de exponerla conviene advertir que por membrana celular entendemos la *superficie limitante del protoplasma*, la cual coincide muy a menudo con la cubierta externa celular, pero otras no, por ejemplo, una célula vegetal en plasmolisis posee su protoplasma contraído y alejado de la cubierta celulósica; pues bien, lo que regula los

(1) Para ampliar en esta cuestión son muy recomendables los tratados: *Kolloidchemie des Protoplasmas*, por W. Lepeschkin, 1924, editor Julius Springer, Berlín, y el ya citado de Rudolf Höber *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. 6.ª edición.

cambios de la parte viva celular del protoplasma con el medio es la capa externa de éste, en cuya capa hay o no hay una formación diferente del resto (*plasmahaut* de los alemanes), pero es siempre a su través que se verifican los cambios de materia entre célula y medio. Overton creía que esta capita se comportaba frente a materias disueltas como si fuese una película lipoidica, añadiendo, que sólo los compuestos químicos que son solubles en los lipoides de la membrana protoplasmática serán los aptos para la diósmosis, la cual se verifica tanto más lentamente cuanto menor sea el cociente de repartición entre el lipoide celular y el agua. Para aclarar este concepto fijémonos en los hechos que indujeron a Overton para exponerlo. Entre éstos debemos citar los estudios de Ehrlich sobre coloración del sistema nervioso con los colorantes llamados neurótropos, que se observó en seguida que eran también lipótropos ; es decir, que tales colorantes intravitales del sistema nervioso penetran fácilmente en las grasas, lo que parece indicar que las condiciones de solución del colorante en las grasas y en el tejido nervioso son semejantes. Hoffmeister estudió la repartición de ciertas substancias introducidas en el organismo, como colorantes vitales, etc., entre células diferentes, suero, etc., buscando lo que él llamaba *afinidades mecánicas*. Observó que el cloroformo se reparte con más facilidad en las células que en suero porque es almacenado prontamente por la lecitina, colesterina y grasas oleosas de aquéllas. Spiro hizo notar que tales *afinidades mecánicas* no eran sino solubilidades relativas. Con estos hechos comenzó Overton a estudiar la solubilidad relativa de muchas substancias en aceites comparándola con la de ellas en el agua, y sobre todo con su facultad de penetrar en la célula. Observó que ciertos cuerpos penetraban muy difícilmente en la célula, otros no tanto, pero la penetración era aún lenta, otros por fin penetraban con más facilidad y vió que precisamente podría servir como dato decisivo para conocer la permeabilidad de tal substancia en el protoplasma, el de su relativa solubilidad en las grasas líquidas. A mayor solubilidad en ella correspondía una mayor permeabilidad de la membrana para la substancia estudiada.

Hablamos de solubilidad relativa, porque de lo que se trata, es de que puesta la substancia en presencia del agua, por ejemplo, y de la grasa, averigüemos la proporción en que se disuelve en ambos medios. El hacía sus experimentos agitando un peso cuidadosamente medido del cuerpo a investigar, en una mezcla de agua y aceite en proporciones conocidas ; luego separaba el agua, la evaporaba y pesaba el residuo seco que era evidentemente la porción de aquél disuelta en ella ; el resto sería lo disuelto en el aceite. Según la solubilidad relativa conocida por tanteos, tomaba más o menos cantidad de aceite o agua en las pruebas más precisas. Si la substancia a investigar era líquida y miscible en ambos, se veía al separarse por reposo y tras la agitación el aceite y el agua, el aumento de volumen de ambos.

Para el estudio de narcóticos, venenos, etc., utilizaba un reactivo fisiológico. Es decir, hacía de ellos una disolución acuosa, cuya concentración era justo narcotizante o venenosa para ciertos animales (renacuajos, dafniás, ciclops, etc.). Luego preparaba concentraciones mayores que, como es natural, poseían una acción narcotizante venenosa mucho mayor, y las agitaba con aceite en proporciones conocidas y cada vez más grandes hasta que la solución obraba como la primera. Era señal de que el aceite había robado a la solución acuosa su exceso en el veneno o narcótico, etc. Vió tras de estos estudios que desde el punto de vista fisiológico, lo decisivo no era precisamente la solubilidad de aquellas substancias en el aceite, sino en substancias semejantes a éste (lipoides), y deseando encontrar tales lipoides, observó que los que daban mejor la pauta de solubilidad, relacionada directamente con las propiedades fisiológicas de penetración celular, etc., eran la lecitina, la colesterina, etc., de que hemos hablado ya y que son tan abundantes en el estroma celular.

Para imitar las membranas orgánicas, se hicieron membranas lipoidicas artificiales. Fourneau y Vulquin, en 1898, lograron impregnar membranas de colodión con determinadas cantidades de lecitina, colesterina, aceite de ricino, etc., resultando tales membranas no atravesables por ciertas substancias orgánicas y sí, en cambio, por el clorhidrato de cocaína, estovaína y otros alcaloides. Respecto a los ácidos orgánicos débilmente disociados eran más o menos permeables, no así, en cambio, los inorgánicos para los que tal membrana resultó impermeable. De estos hechos se desprende que dichas membranas lipoidicas, funcionaban como *medios de disolución* de las substancias que dejaban pasar, y como es natural se utilizaron tales deducciones para aclarar fenómenos biológicos tan interesantes como los llamados

Hemolisis y citolisis

Sabido es que para estudiar la primera se preparan suspensiones de glóbulos rojos en soluciones isotómicas de ClNa, y se añaden en diferentes tubos que las contienen cantidades crecientes de la substancia cuyo poder hemolítico se quiere estudiar, dejando únicamente el testigo sólo con sal. Al cabo de cierto tiempo se habrán depositado en el fondo los glóbulos rojos de todos, pero en el tubo testigo el líquido que sobrenada es incoloro, al paso que a partir de cierta concentración de la substancia hemolítica se colorea el mismo en rosa, en otro tubo en rosa fuerte, rojo, etc. Esto es debido a que la hemoglobina ha salido en tales casos de los glóbulos rojos en que estaba contenida y se ha disuelto en el líquido ambiente. Pues bien; para los glóbulos rojos de ternero se ha visto que las substancias eran tanto más hemolíticas (siendo químicamente indiferentes), cuanto mayor era su poder disolvente del aceite o de los lipoides.

La explicación de la hemolisis con la teoría lipoidica es sencilla: las substancias hemolíticas, disolverían los lipoides de la membrana lipoidica protoplasmática, y con ello la harían permeable para el contenido celular que se escaparía por difusión a su través. Podrían llegar

tales líquidos hemolíticos a introducirse tanto en el contenido celular disolviendo sus lipoides, que viniese la separación de la célula, liquidándola.

Observemos que aquí es el líquido de fuera el que disuelve los lipoides; abre las puertas a lo de dentro, y no son las substancias de dentro las que se disuelven en los lipoides de la membrana y pasan así a su través, como se cree sucede en la mayoría de los casos.

También se ha pensado que tales líquidos orgánicos hemolíticos podrían previamente reaccionar químicamente con los lipoides, disolviéndolos de este modo. Así, RAMSON encontró que la acción hemolítica de la saponina, descansa en el hecho de entrar en reacción con un lipoide del estroma celular, la colesterina, y que basta añadir colesterina al suero que contiene saponina, para que reaccionando ambas, se *desvíe* la saponina y no aparezca la hemolisis. Quizá según esto las hemolisinas obrarían corroyendo los glóbulos rojos. Experiencias realizadas con membranas lipoidicas artificiales han venido a confirmar tales hechos, habiendo visto que existen grandes analogías entre éstas y las de los glóbulos rojos.

La *citolisis* debe ser un fenómeno idéntico, ya que todas las células son ricas en lipoides. En algunos órganos de las plantas es fácil observarlo porque sale de ellas una materia colorante, la antocianina, que nos la puede denunciar.

Partenogénesis [1]. Estos agentes citolíticos son los que provocan, según LOEB, el desenvolvimiento de huevos no fecundados de erizos de mar, etc., es claro que actuando en condiciones adecuadas de concentración y tiempo. O. y R. HERTWIG y HERBST observaron que el cloroformo, toluol, xilol, etc., provocan la formación de la membrana llamada, «de fecundación» que se produce normalmente tras la entrada del espermatozoide en el huevo. Pues bien; como hemos dicho, los agentes que provocan la formación de esta membrana y la partenogénesis del huevo son precisamente los disolventes de lipoides citados y los ácidos orgánicos de la serie grasa y precisamente en la medida de la solubilidad de los lipoides en ellos. Es, pues, preciso notar esta coincidencia, como indicamos antes, que también los agentes coagulantes eran provocadores de la partenogénesis.

Inconvenientes de esta teoría considerada exclusivamente

El agua entra y sale en la célula, como es sabido, y tal no podría suceder si la membrana protoplasmática fuese exclusivamente lipoidal, y esto ya lo reconoció OVERTON. Respondiendo a tal objeción, NATHANSOHN suponía que la membrana debía estar formada por una especie de mosaico, parte de él lo constituían los lipoides, y el resto sería un material cuyas propiedades serían análogas a las de las membranas semipermeables de TRAUBE. Pero es claro que a través de estos últimos pasarían toda clase de substancias, y no sólo las solubles en los

[1] Véase también aquí influencia de agentes coagulantes.

lipoides. Es notable advertir que las células son, en general, impermeables, precisamente para las substancias que necesitan, azúcar, hidratos de carbono, aminoácidos, ciertas sales minerales, etc., y en cambio, entran por ser solubles en los lipoides substancias que no tienen gran importancia en la economía celular. Claro que también se debe tener en cuenta que lo mismo que no pueden entrar dichas substancias últiles, tampoco pueden salir, y como muchas de ellas las fabrican, resulta una disposición muy adecuada para no perderlas. Pero es seguro que la *célula debe poseer algún mecanismo en su superficie que pueda regular la entrada y la salida de los productos que necesita y de los que le perjudican.* Debe existir un medio para permitir en un momento dado la salida o entrada de substancias que se comportan ordinariamente como imposibles para atravesar las membranas semipermeables. La conclusión es, que ni la ósmosis sola, con las anomalías aparentes explicadas al hablar del equilibrio de DONNAN, ni la teoría que considera a la capa externa protoplásmica como una membrana lipoidica, con la modificación de NATHANSOHN, sirven para explicar muchísimos de los fenómenos existentes en las relaciones químicas entre la célula y el medio. Por eso se ha recurrido a otras teorías como la **Teoría adsortiva de la permeabilidad de la membrana.** TRAUBE ha hecho la observación de que existe otra cualidad de las substancias disueltas que va paralela con la permeabilidad celular y es su poder modificador de la tensión superficial del agua respecto del aire. Por el teorema de GIBBS-THOMSON (véase Adsorción) sabemos que cuanto más disminuye una substancia la tensión superficial de un líquido en el que está disuelta, tanto más se acumula en la superficie de éste, lo cual quiere decir que tanto menos es atraído por el líquido. Y TRAUBE dice, tales substancias por acumularse en la superficie límite de este medio, o sea alrededor de una célula, por ejemplo, bañada por él y por ser poco atraída por el agua, tendrán más probabilidades de ser atrapadas. Hay que advertir que aquí lo que interesa es no tanto la acumulación citada en la superficie límite del agua aire, como indica TRAUBE, sino la concentración alrededor del líquido protoplasmático, es decir, por decirlo así, su adsorbilidad por la capa límite protoplasmática. Ahora sabemos que la adsorbilidad que nos interesa va casi siempre paralela con el poder modificador de la substancia respecto a la tensión superficial agua-aire medida por los procedimientos estalagmométricos. Pero como se comprende, tal teoría sólo explica una aproximación de las substancias disueltas al protoplasma, pero no su incorporación a él, por lo cual resulta una teoría incapaz como las dos anteriores de explicar la permeabilidad tan complicada y tan unida al fisiologismo celular de la capa externa del protoplasma. Existe también la **teoría de la membrana ultrafiltrante**, según la cual hay una relación grande entre la permeabilidad de la membrana para una substancia y el tamaño de las moléculas de ésta; a mayor tamaño su permeabilidad es menor. RUHLAND, su inventor, ha trabajado últimamente con bacterias llamadas sulfhídricas, *Beggiatoa mirabilis*, en

las que por medio de soluciones hipertónicas provocaba la formación de encorvamientos, arrugas, etc. No se producía plasmolisis típica porque en ellas indudablemente la capa limitante protoplasmática debe estar unida a la celular, de modo que la contracción de aquélla provoca la de la célula total, no se separan ambas membranas como en la plasmolisis verdadera de otras células vegetales. Una vez conseguido este encorvamiento, medía el tiempo y la concentración de la substancia a investigar, que eran necesarios para producir la rectificación celular (estado primitivo). Tal rectificación no podrá ser debida como se comprende más que al ingreso en la célula en la substancia ofrecida con el disolvente. Así conocía indirectamente la permeabilidad celular para ella.

Entre los resultados interesantes de tales trabajos [1] debemos citar : Tal relación entre permeabilidad y tamaño molecular se refiere sobre todo a substancias orgánicas, pues las minerales poseen en general moléculas pequeñas, así que para las sales dice : « Los cationes obran disminuyendo el hinchamiento por imbibición (Quellung) de los coloides del protoplasma y en el mismo grado disminuyen la permeabilidad celular (serie lyófila de HOFFMEISTER) ; los aniones favorecen aquel hinchamiento (solución, peptización) y en el mismo grado aumentan la permeabilidad celular. » Tales resultados coinciden con los de KAHHO y otros, encontrados para plantas superiores. Es notable que tal ley rige también para las células muertas de *Beggiatoa* lo cual excluye la participación de alguna cualidad especial del plasma viviente.

Para las substancias orgánicas es para las que halló la dependencia más estrecha entre tamaño molecular y permeabilidad, aunque existen compuestos en los que no se verifica tal reacción. También aquí se verifica la misma ley para las células muertas, sólo que en este caso todos los valores de la permeabilidad estaban alterados en el sentido de denunciar un aumento considerable de ella en el estado de muerte celular. Como en las células vivas parece que debe ser el protoplasma, y sobre todo su capa externa la que debe regir los cambios entre célula y medio; y, en cambio, en las muertas parece que alterado aquél debe ser la membrana celular la barrera; debemos concluir que en circunstancias normales las substancias para ingresar en la célula deben pasar por dos filtros, el de poros más anchos (membrana celular) y el de poros más estrechos (membrana protoplásmica).

No pudo hallar el tamaño crítico (límite de entrada) pero indica que aunque despacio penetra la gigantesca molécula de veratrina 723,5 $\mu\mu$.

Por verificarse las mismas reglas, tratándose de células muertas que de las vivas, cree que la cuestión de la permeabilidad celular es un hecho puramente físico, opinando que no existe una permeabilidad fisiológica (acción protoplasmática especial). Pero añade luego, « aunque se concediese a esta teoría el derecho a formar el cuadro más

(1) *Ein Bertrag zur Ultrafiltertheorie des Plasmas.* RUHLAND y HOFFMANN (*Arch. f. wiss. Bot. I.* 1925).

ancho en la interpretación de la permeabilidad celular, habría dentro de él un ancho campo para el juego de disposiciones fisiológicas y de características particulares tanto del plasma como de los materiales a penetrar en él.

MICHAELIS ha realizado últimamente experiencias numerosas de permeabilidad a través de membranas muertas. Ha utilizado como objeto de investigación, por ejemplo, el papel-pergamino de SCHLEICHER-SCHUELL en forma de saquitos como los utilizados para las experiencias de diálisis. Es claro que tal membrana por dejar pasar a su través los no coloides y detener en general los coloides, no es comparable a las fisiológicas que demuestran poseer en muchos casos una tan fina selección, y, sin embargo, ha deducido consecuencias interesantes. Colocaba dentro y fuera del saquito soluciones diferentes de electrólitos, por ejemplo, dentro una solución 0,1 *n* de KCl y fuera una 0,01 *n* de la misma sal, y observaba que en poco tiempo se establecía un estado de equilibrio prácticamente estacionario durante algún tiempo, entre ambas soluciones. Medía las concentraciones de los iones de dentro y de fuera por la diferencia de potencial entre ambas soluciones, cuya diferencia de potencial la averiguaba valiéndose de procedimientos cuyos fundamentos indicaremos al hablar del « Método electrométrico de medición de iones H ». Comparaba luego esta diferencia de potencial con la obtenida para las mismas soluciones puestas en contacto libremente, mediante artificios y sin intermedio del papel pergamino. Y veía que si la diferencia de potencial era en mil voltios igual a O para el caso citado y en contacto libre, subía a + 10 en la solución más diluída al hallarse ambas soluciones separadas por la membrana de pergamino. Otras sales daban diferencias de potencial muy diversas en idénticas condiciones, y tales resultados son debidos, según él, a la *gran diferencia de velocidad de los aniones y de los cationes a través de la membrana.* Ha trabajado estudiando la difusión a través de tabiques de diveras substancias, como parafina, caucho, gomagutta, cera, etc., y ha visto que la naturaleza de la membrana y sobre todo su *carga eléctrica* tenían una influencia decisiva para el establecimiento del equilibrio. *En general, las membranas electronegativas dificultan la movilidad o difusión a su través de los iones negativos, las electropositivas de los iones positivos.*

Para los no electrólitos, además de esta circunstancia, encuentra que tiene gran importancia el *tamaño de los poros de la membrana* y el *de las moléculas*, en lo cual coincide con la teoría *ultrafiltrante*, y con las experiencias de COLLANDER, que ha demostrado que los diferentes alcoholes pierden en difusión a través de membranas de ferrocianuro de cobre, a medida que aumenta la largura de la cadena de los átomos de carbono que los constituyen.

Tales son algunos de los más importantes métodos y teorías existentes acerca de un asunto de tal interés como es el de la permeabilidad celular, que hoy sigue siendo uno de los problemas biológicos más enigmáticos, de más trascendencia y más afanosamente trabajados.

CAPÍTULO VIII

Sobre concentración de iones H y de iones OH

Importancia especial de ambas especies de iones

De antiguo se conocía la importancia de la basicidad o de la acidez de reacción de un medio en donde se realizaba tal o cual fenómeno biológico o químico. Hoy se ha visto que aun es mayor el interés de este dato de lo que antes se suponía, y que no bastan los procedimientos antiguos de determinación de la reacción de un medio para apreciar las pequeñas diferencias a las que tan sensibles se muestran muchos fenómenos. Se necesita precisar con gran exactitud tal carácter, y crear una nomenclatura nueva para poder definir sus más pequeñas variaciones. Respondiendo a tal necesidad se ha creado este capítulo tan interesante de la Biología, que pudiéramos llamar « Determinación precisa del estado de acidez, neutral o de basicidez de los medios » o lo que es lo mismo « Determinación de la concentración de los iones de hidrógeno y de los hidroxiliones que son los responsables directos de tales condiciones.

Por otra parte, no es posible adquirir una concepción clara de la manera de obrar fisiológica de cualquier ión sin tener en cuenta la de los iones H y OH siempre existentes en las soluciones acuosas, ya que la influencia de éstos en Biología es tan grande que es necesario no perderla nunca de vista, aun en las soluciones que antiguamente se tenían por neutras. Y no sólo en Biología sino en química coloidal tiene este dato un interés muy grande para la producción de variaciones en diferentes fenómenos, como precipitaciones, hinchamientos por imbibición, coagulación, carga eléctrica, etc. En el estudio de las fermentaciones este factor hay que tenerlo en cuenta, por ejemplo, tanto como el de la temperatura, los óptimos de concentración de iones H y OH oscilan a veces en límites muy estrechos, hasta el punto de que los estudios sobre cinética de las fermentaciones realizados antes de conocerse la importancia de este dato, ha sido necesario revisarlos. Afortunadamente, en estos casos se trabaja con soluciones muy bien provistas de reguladores de tal concentración y sin saber los antiguos trabajaban con frecuencia en medios de acidez o basicidad constante, y, por lo tanto, en estos casos son aceptables sus conclusiones. En Medicina es conocida la importancia de la acidez, por ejemplo, de la sangre, en procesos como la diabetes, etc. El autor ha encontrado que los espermatozoides de los crustáceos decápodos reaccionan específicamente frente a soluciones, que poseen débiles concentraciones ácidas de H, como son las que poseen un valor $ph = 6{,}5$ [1] (fig. 50).

En agricultura citaremos la escuela de Grönningen (Holanda) que dice que la concentración del suelo en iones H y OH es uno de los factores decisivos para conocer la aptitud del suelo respecto a poder servir para un cultivo determinado. En Terapéutica, Traube indicó que todas las substancias activas como modificadoras de la tensión superficial tienen gran poder farmacológico. Pero los alcaloides son activos respecto a la tensión superficial de sus soluciones sólo condicionalmente, es decir, dependientes de las concentraciones en ellas de otros iones y en especial de los iones OH. Así es que si se pregunta, por ejemplo, acerca de la concentración en qué comienza a sentirse

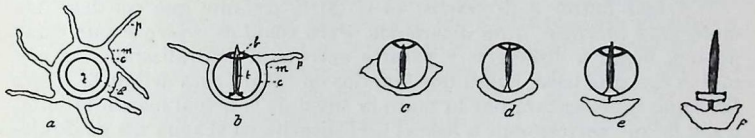


FIG. 50. Acción de iones-H sobre los espermatozoides de los crustáceos (Carcinus Moenas) (según J. M. SUSAETA)

a y *b*, espermatozoide normal de frente y de perfil ; *c*, *d*, *e*, primeros estados de los mismos bajo la acción de débiles concentraciones de ácidos $p\text{-}H = 6{,}5$; *f*, estado final bajo la acción de concentraciones mayores. (Tamaño 4-5 μ)

la acción de la quinina sobre un proceso fermentativo, o en qué empieza su poder bactericida en una suspensión de bacterias, se observa que tal valor no es absoluto; al citarlo hay que indicar al mismo tiempo la concentración de iones H, pues varía aquél con ésta.

En Oceanografía es un dato biológico de gran interés y del que no se puede prescindir, el conocimiento de la concentración de iones H y OH. Podrían citarse muchísimos ejemplos como éstos, pero basten los indicados para percatarse de su importancia biológica [2].

Pero hay además otro motivo que justifica la busca de nuevos métodos de dosificación y de nomenclatura de los iones-H, y es el siguiente, que se refiere a las ideas sobre acidez y alcalinidad actuales,

---

(1) *Notes sur l'éclatement des spermatozoides des Crustaces decapodes*, JOSÉ M. SUSAETA (*Bulletin biologique de la France et de la Belgique*. 1925).

(2) Para más detalles *Die Wasserstoffionen-Koncentration*, por LEONOR MICHAELIS, editor J. Springer. Berlín, 1922 ; y *Praktikum der Physicalischen Chemie insbesondere der Kolloidchemie für Mediziner und Biologen*, por L. MICHAELIS. Berlín, 1922. Editor J. Springer. Es también muy interesante el libro titulado *La concentration en ions Hidrogène de l'Eau de mer, Le pH méthodes de mesure ; importance oceanographique, géologique, biologique*, par R. LEGENDRE, 1925. « Les Presses Universitaires de France », 49, Boulevard Saint-Michel, París.

latentes y totales. Sabemos nosotros que, como lo hemos dicho en el capítulo III, los electrólitos disueltos en el agua se disocian en sus iones en cierta proporción (ya hicimos, capítulo IV, la salvedad teórica que las ideas actuales imponen a esta concepción), de tal modo que prácticamente podemos aceptar que tales substancias se hallan en el agua en diferente forma, una parte se presenta en forma de moléculas aisladas pero no disociadas, y la otra en forma de iones resultantes de la disociación de otras moléculas. Así, por ejemplo : si decimos que el ClH disuelto en el agua a 18°, y a la concentración correspondiente a su solución llamada normal (36 gr. por litro de agua), se disocia un 80 %, queremos indicar que el 80 % de sus moléculas están disociadas en sus iones Cl y H y el 20 % restante se halla en forma de moléculas sin disociar de ClH.

Pues bien, se llama *acidez actual o real* a la que corresponde a la porción que está en forma *activa*, o sea *ionizada*, que es la forma obligada para reaccionar, en este caso es la porción disociada como hemos dicho el 80 %.

Acidez latente o de reserva es el 20 % restante que contiene las moléculas *inactivas* o no disociadas. Pero como es evidente que éstas pueden llegar a disociarse y pasar a activas, si neutralizamos las primeras con una base, habrá que tenerlas en cuenta para definir la *acidez total* que representará por lo tanto la suma de la actual más la latente, o sea la que corresponde a *todo* el ClH disuelto en el agua sea cualquiera la forma en que esté.

Absolutamente lo mismo hubiésemos dicho de haber tomado como ejemplo un álcali, como el NaOH que se disocia en iones Na y iones OH o hidroxiliones ; en este caso hubiésemos hablado de *alcalinidad actual, latente y total.* Como analogía clásica, se cita aquí la repartición de las fuerzas de un Estado que como se sabe consta de un ejército activo, equivalente a la fuerza actual o real, el ejército de reserva que representa la fuerza latente ; y por último el total que estará constituído por la suma de los otros dos. También aquí, a medida que la guerra va consumiendo las fuerzas activas, se llama a las reservas para convertirlas poco a poco en fuerzas actuales o reales, de latentes que eran. Ahora bien ; como sabemos, la dosificación de los ácidos o de las bases en la química clásica nos da idea de la acidez o basicidad totales solamente, y nada dice respecto a las otras que tanto interesan al fisiólogo o al biólogo en general. Esto se verá mejor analizando el modo cómo se verifica tal dosificación.

Supongamos que preparamos una disolución normal de ClH y que tomamos de ella 10 cm.³, añadimos una gota de un indicador, sea la fenolftaleína, que en reacción ácida es incolora, pero que se vuelve roja al pasar la reacción a básica. Preparamos otra solución normal de NaOH (40 gr. en un litro de agua), y comenzamos a neutralizar lentamente la primera solución mediante la adición de la segunda. Al añadir 1 cm.³ de ésta, habremos neutralizado 1 cm.³ de la n. ClH, con 2 de la n. NaOH habremos neutralizado 2 de la n. ClH, y así sucesivamente conforme a la fórmula $ClH + NaOH = ClNa + H_2O$. Necesitaremos, por lo tanto, 10 cm.³ de solución n. NaOH para neutralizar los 10 % de la solución n. ClH y añadiendo una gota más de la primera, la reacción que ya era neutra pasa a básica y veremos que el líquido se vuelve rojo.

Aquí hemos hallado la acidez total. E. E. al añadir 1 cm.³ de n. NaOH, esta base neutraliza los *iones libres* o *activos* de H, pero al mismo tiempo que estos desaparecen, las moléculas no disociadas de ClH se disocian para sustituir a aquéllas pasando de latentes a activas, de no ionizadas a ionizadas, de tal modo que al poco tiempo no existen ya moléculas sin disociar y no hay medio de reconocer la proporción entre las que al principio se hallaban disociadas y las que no lo estaban. En una palabra, sólo podemos averiguar así la *acidez total.* Lo mismo diríamos en el caso recíproco de dosificación de una *base*, o en el caso de determinación de la cantidad de Cl o de otro elemento cualquiera en análisis cuantitativo. Pero lo que conviene al biólogo, al fisiólogo y aun al químico, sobre todo al que trabaja con coloides, es precisamente el estado de ionización, la acidez o basicidad *actuales* en el caso de ácidos o bases, que son las que evidentemente imprimen las cualidades características al líquido que se considera. Por eso no podremos utilizar para determinarlas reacciones que hagan desaparecer los iones, sino buscar medios que sin alterar el estado de disociación de la solución, nos dé idea solamente de la parte activa o ionizada, de la que realmente entra en reacción en un momento dado. En una palabra, se trata de hacer *ionimetría* y no dosificación de elementos, y para ellos nos valemos de dos medios, o bien de colorantes escogidos que cambien de color, en un momento preciso y perfectamente determinado de concentraciones de iones H y de hidroxiliones, para el caso de acidez o basicidad ; o bien de procedimientos electrométricos cuando hagamos ionimetría en general, es decir, cuando se trate de determinar, no sólo iones H o iones OH sino otros cualesquiera como son iones Cl, Fe, etc. Ahora se comprenderá el motivo que ha obligado a buscar los métodos cuyo fundamento vamos a exponer en seguida.

Dosificación y medida. Si queremos preparar una solución en que la concentración de iones Cl, sea una dada, bastaría disolver la cantidad calculada de ClNa, como índice de la de Cl. En cambio, si añadimos a una solución algo de ácido acético, por ejemplo, se disociará sólo una pequeña parte de éste y no podremos indicar sin más, la cantidad de iones H que hemos añadido. Necesitamos para la dosificación, lo mismo que para la determinación y notación de los iones H y OH métodos especiales.

Unidad de medida y notación. La concentración de iones H viene expresada en iones-gramo por litro. Se ha tomado como unidad de concentración aquella en que un gramo de H-ion está disuelto en

un litro de agua, o sea una *solución normal* (1) de iones H. Una tal solución sería sencillamente una normal de ClH, o sea 36 gr. (35 + 1) de éste en un litro de agua, pues si admitiésemos que la disociación de tal ácido fuese total, entonces habría un gramo de hidrógeno ionizado en un litro. Pero como la disociación no es total, la experiencia ha demostrado que es preciso tomar una solución 1,25 veces la N de ClH para obtener la N de iones H. Esta tiene un gramo de H-ion por litro. Todos los líquidos fisiológicos poseen concentraciones mucho menores. Así, por ejemplo, la orina normal posee alrededor de 0,00000032 gramos de iones H en un litro, como tal número resulta inmanejable, SORENSEN propuso expresar la concentración de iones de $H\,(\overset{+}{H})$ ó C_H ó (H) escribiendo sencillamente *h*, y expresándola por un símbolo *ph* cuya significación es ésta :

$$ph = -\log^{10} h = \log \frac{1}{h}.$$

La concentración de iones (OH) o hidroxiliones *oh* se expresa por el símbolo p_{oh} y esto quiere también decir que

$$p_{oh} = -\log^{10} oh = \log \frac{1}{oh}.$$

El producto $h \times oh = Kw$ que es la constante de disociación del agua y siempre se verificará sea la disolución acuosa ácida, neutra o básica que $h \times oh = K$ ó lo que es lo mismo, tomando sus logaritmos $ph + poh = p_k$. Este p_k indicaría también $-\log^{10} K = \log \frac{l}{K}$.

Ahora bien; KOLHRAUSCH, después de exactas medidas realizadas por los procedimientos físicos adecuados, sobre todo por la medida de la conductibilidad eléctrica del agua halló para la constante de disociación de ésta o sea *K* a 18° = 0,72 × 10^{-14}, lo que corresponde un valor de $p_k = 14{,}14$; a 37° encontró 0,32 × 10^{-14} ó sea $p_k = 13{,}50$. Por eso SORENSEN propuso que el punto neutral del agua fuese aquel en que los iones H fuesen igual a los iones OH, lo cual se realiza siendo el valor de ambos = 7,07 y a 18°. Así se verifica que $ph + poH = p_k$, pues 7'07 + 7'07 = 14,14. Según esta notación una solución neutra se caracteriza

a 18° $h = oh = 0{,}85 \times 10^{-7}$ ó sea $ph = poh = \mathbf{7'07}$
a 37° $h = oh = 1'77 \times 10^{-7}$ ó sea $ph = poh = \mathbf{6'76}$

En reacción ácida es $h >$ en reacción neutra
» » » » $ph <$ » » »
» » » » $oh <$ » » »
» » » » $poh >$ » » »

(1) Se sabe que se llama en Química solución normal de un cuerpo a aquella que contiene en un litro de agua la cantidad en gramos de aquél igual a su peso molecular . Así si el peso molecular de ClH = 36. Su solución normal contendrá 36 gr. de ClH en un litro.

Como es lógico, en reacción básica sucederá lo contrario. Pongamos un ejemplo : Leemos que la orina normal se caracteriza por tener a 18° $ph = 6{,}5$. Según lo dicho $ph = \log \frac{l}{h}$; en este caso $\log h = -6'5$ para saber la concentración de iones H que representa tal expresión tenemos que hallar el número correspondiente a ese logaritmo. Como en la tabla de logaritmos sólo encontramos las mantisas de los números positivos, tendremos que transformar nuestro logaritmo negativo en otro de mantisa positiva y característica negativa, poniendo : $-6{,}5 = +0'5 - 7$, buscamos ahora en las tablas de logaritmos el número correspondiente a la mantisa 0'5, y encontramos que es 32, como la característica — 7 nos indica el lugar que este número debe ocupar tras de la coma, resultará que el valor numérico correspondiente a $ph = -6'5$, es 0,000.00032 de gramos de iones H en un litro de orina normal. Los OH y los H de la reacción neutra los hallaríamos sabiendo que $ph = poh = 7'07$ y que $7'07 = +0'93 - 8$, y el número correspondiente es 0,000.000.085 gramos iones H ó iones OH en litro de agua neutra a 18°. En análisis químico corriente, estos valores serían completamente ilusorios, lo mismo da que en caso citado de la orina pusiésemos como valor de sus iones H 0,32 × 10^{-7} que 0,32 × 10^{-8}, ambas cantidades son para los métodos ordinarios prácticamente igual a O, y sin embargo, la segunda sería ya claramente patológica. Al decir en el análisis corriente que en una solución no hay Cl, por ejemplo, queremos sólo indicar que el Cl que puede haber es menor que el que corresponde al delatado por una gota de $AgNO_3$ en solución al 0,01 normal a lo más, y no se puede pasar de ahí. Pero en Fisiología, en Medicina y en Biología tienen interés grandísimo variaciones mucho menores, de aquí ha nacido el tener que recurrir a procedimientos y nomenclatura especiales. Los procedimientos eléctricos, cuyos fundamentos daremos al final, acusan diferencias de potencial en milivoltios, correspondientes a diferencias de concentración de los líquidos, del valor indicado. Otro procedimiento menos exacto, pero más corriente, es el colorimétrico, basado en el cambio de color experimentado por ciertas substancias que los químicos llaman

Indicadores

Estos son substancias colorantes generalmente en disolución, que cambian de color al variar la reacción del medio. Para W. OSTWALD, tal cambio de color era debido a que los iones del indicador tenían otro color que las moléculas no disociadas y el grado de disociación y, por lo tanto, el color variaba con la acidez o basicidad. Según HANTZSCH, el cambio es debido a una modificación estructural de la molécula del indicador. Sea como quiera la explicación, es importante conocer el momento de la variación del color de los indicadores más usados, por eso damos el dato de los siguientes :

La solución de naranja de metilo cambia cuando $ph = 4$
» » » rojo » » » » $ph = 6$
el tornasol varía siendo $ph = 7$
y la fenoltaleína » » $ph = 8$

Se ve que los tres primeros tienen su cambio siendo todavía el medio francamente ácido, el último en medio básico, pero los dos últimos son los más aproximados para la apreciación del punto neutro, siendo el error del tornasol por acidez y el de la fenolftaleína por basicidad.

Como valores interesantes para el fisiólogo, indicaremos que la sangre en circulación tiene un valor de $ph = 7'35$ hasta $7'40$ (ligeramente básica) ; para la orina normal $ph = 5$ a 7, es decir, desde francamente ácida a muy ligeramente, casi básica ; el caldo de cultivo debe poseer $ph = 7$ a $7'5$ (prácticamente neutro) ; el agua ordinaria sin hervir tiene $ph = 6$ y hasta 5, su acidez se debe al CO_2 que disuelve, por eso al hervir lo puede perder y recién sacada de la fuente es casi neutra $ph = 7'5$ a $7'6$; el jugo estomacal es francamente ácido $ph = 1'5$ hasta 2, etc. Es notable la resistencia que oponen los líquidos orgánicos a variar su valor *ph*, aunque, por otra parte, se comprende que tal resistencia sea indispensable para la conservación de la vida ; los estrechos límites del valor de *ph* de la sangre circulante, nos indica que tal dato, como el de la temperatura, son de importancia vital para el organismo, y que éste debe disponer de algún medio que le permita automáticamente regularlo en el caso de que cualquier alteración interna o externa lo comprometa. Tal mantenimiento del valor normal de *ph* en la sangre y, en general, en una solución, se consigue en virtud de substancias allí existentes, o de mezclas de ellas adecuadas, que se conocen genéricamente con el nombre de reguladores.

Papel y funcionamiento de los reguladores (Puffer de los alemanes)

En una mezcla de un ácido débil con una de sus sales, *ph* es casi exclusivamente dependiente de la relación entre el ácido y su sal, y apenas del valor absoluto de la cantidad de ambos; de tal modo, que si diluímos la mezcla no varía *ph* o apenas varía. Esto quiere decir que se verifica el hecho extrañísimo de que su acidez o basicidad permanece constante a pesar de añadir agua pura. Todos sabemos, en cambio, que si añadimos a una dilución de HCl al 10 %, agua hasta hacerla al 1 %, su acidez la hemos hecho diez veces menor, es decir, en cada cantidad de volumen de la dilución al 1 % la acidez, o sea *ph* son $\frac{1}{10}$ de la que contiene la solución al 10 %, dicho esto en términos generales. La explicación elemental de aquel hecho anómalo anotado, es la siguiente : Un ácido débil está, siempre poco disociado en agua, y esta disociación está disminuída, además, por su sal. Si diluímos la mezcla de ácido-sal, es claro que disminuirá la concentración del ácido, pero al mismo tiempo crece su disociación y con ello los iones H, porque la dilución ha disminuído en igual grado al poder frenador de la disociación del ácido que su sal posee.

El nombre de regulador, o de mezcla reguladora, se debe al papel mantenedor del número de iones H o, lo que es lo mismo, de iones OH que tales substancias poseen, a pesar de variar el grado de dilución de su solución. Un ejercicio práctico muy instructivo es el siguiente : Se prepara una solución normal de acetato sódico cristalizado ($CH_3COOHa + 3\,H_2O$) ; calculando resultan 13,61 gr. de la sal cristalizada disueltos en 100 cm.³ de agua destilada. Aparte preparamos una solución normal de ácido acético dosificado con n-NAOH, tomando la fenoltaleína como indicador. Diluímos las dos hasta hacerlas 1/10 n. Tomamos ahora cuatro tubos de ensayo, y en ellos preparamos mezclas de los dos en las proporciones indicadas en el cuadro siguiente :

Tubos	1	2	3	4
De solución 0,1 n. de acetato sódico cm.³	5	7	8,5	9
De solución 0,1 n. de ácido acético cm.³	5	3	1,5	1

Como se ve, en cada tubo resultan 10 cm.³ de mezcla escogidas así, porque dan colores diferentes con el indicador que luego utilizaremos.

Tomamos otros cuatro tubos de ensayo y cogemos en cada uno 8 cm.³ de agua destilada y añadimos a cada uno de ellos 1 cm.³ de las soluciones correspondientes preparadas antes. Si llamamos a los tubos de la 2.ª serie 1′, 2′, 3′ y 4′, resultará que el primero 1′ tiene 8 cm.³ de agua y 1 cm.³ de la mezcla del tubo 1.° de la 1.ª serie ; el 2′ tiene 8 cm.³ de agua y 1 cm.³ de la mezcla del tubo 2.° de la 1.ª serie, y así sucesivamente. Resulta que los 8 tubos tienen al final 9 cm.³ de líquido, y que los 1′ 2′ 3′ 4′, representan las mezclas contenidas respectivamente en 1, 2, 3, 4 pero diluídas nueve veces. Añadimos entonces a todos ellos, cantidades exactamente iguales del indicador escogido que es el rojo de metilo (0,1 gr. en 300 cm.³ de alcohol de 90° y 200 cm.³ de agua). A cada tubo se añaden 1 ó 2 gotas de este indicador. Observaremos : 1.°, que en los cuatro tubos de la 1.ª serie, o sea en 1, 2, 3, 4, el colorante toma cuatro tonos, desde el rojo limpio hasta el amarillo, demostración de que la acidez varía con la proporción relativa entre el ácido acético y su sal ; y 2.°, los colores de los tubos de la 2.ª serie son exactamente iguales a los de la 1.ª, es decir, el del 1′, igual al del 1, el de 2′ igual al 2, etc., demostración de que la dilución sufrida en los de la 2.ª serie (nueve veces) no ha alterado en nada la acidezde la mezcla. La acidez depende, por lo tanto, no de la cantidad absoluta de lo disuelto, sino de la relación del ácido acético al acetato sódico, es decir :

$$h = K \frac{\text{(ácido libre)}}{\text{(sal de Na del mismo ácido)}}$$

siendo K la constante de disociación del ácido citado, cuyos valores son en números redondos para el ácido tártrico $= 1 \times 10^{-3}$; para el ácido láctico $= 1'5 \times 10^{-4}$; para el acético $= 2 \times 10^{-5}$; para el fosfato sódico ácido primario $= 2 \times 10^{-7}$ y para el ácido carbónico $= 3 \times 10^{-3}$. El fosfato primario se considera aquí como un ácido, y su sal correspondiente es el secundario. La ley anterior no es aplicable para los ácidos fuertes, como el ClH, SO_4H_2, etc. En la sangre la mezcla reguladora más importante es la $CO_2 + NaHCO_3$, el CO_3Na_2 no existe como tal en los tejidos vivos.

La mezcla reguladora de la orina es la de dos fosfatos

$$NaH_2PO_4 + Na_4HPO_4.$$

Y ya sabemos que los albuminoides son excelentes reguladores de los iones H, habiendo quedado explicado su mecanismo de regulación en el capítulo sobre química coloidal de albuminoides.

A veces se suele tomar como valor de K, uno que es un poco mayor que el de la constante de disociación encontrada por medidas de la conductibilidad eléctrica.

Preparación de una solución que posea una cierta concentración previamente dada de iones H

Este problema de gran interés práctico, se resuelve mediante la fórmula antes dada, que nos sirve para calcular la proporción o relación R en que debemos tomar los dos componentes de la mezcla EE, hemos dicho $h = K \dfrac{\text{ácido libre}}{\text{sal del mismo ácido}}$, si llamamos a este quebrado R, pondríamos $h = KR$ de donde $R = \dfrac{h}{K}$, h nos lo dan, pues, es la concentración pedida y K es conocida. Después de realizada la mezcla con arreglo a este cálculo, se debe controlar si resulta exacto en la práctica, pues la capacidad de regulación no es ilimitada, a pesar de todo. Una solución así preparada posee estas condiciones.

1.° La variación de h es casi nula al diluirla en agua pura.

2.° La resistencia que ofrece a variar h, producida por impurezas, consistentes en productos que añadimos, poseyendo cierta acidez, es mayor que la de otra disolución cuya concentración de h fuese igual, pero no producida por una mezcla reguladora.

3.° Al diluirla no varía h, pero pierde algo su resistencia a dejar cambiar h por impurezas.

El problema de que tratamos se presenta muy a menudo al trabajar con fermentos, pues si encontramos en la literatura o averiguamos nosotros mismos que el óptimo de acción de tal fermento corresponde, por ejemplo a un valor $ph = 6{,}5$, entonces añadiremos al jugo en que está el fermento una mezcla reguladora calculada para producir este valor de h como queda dicho. En general, es la mezcla de fosfatos

la utilizada, y así se puede seguir con tranquilidad los estudios de cinética de esa fermentación en la seguridad de que aunque se produzcan diluciones posteriores del jugo, o lo que es más frecuente, aun cuando en las reacciones fermentativas aparezcan ácidos, se conserva, si tales variaciones no son excesivas, constante este valor tan interesante para la buena marcha del fenómeno, es decir, el valor *ph*.

Sobre la determinación de los iones H

Al decir iones H, se sabe que se habla al mismo tiempo de los hidroxiliones OH, pues siempre tiene que resultar que $H \times OH = K$ (constante de disociación del agua). De tal modo, que al añadir un ácido al agua, aquél se disocia en iones H y en otros iones, sean Cl para el ClH, los iones H aumentan así, y automáticamente disminuyen los OH, que con el exceso de aquéllos reconstituyen el H_2O de la solución.

Principio del método de determinación de iones H mediante indicadores, según Sorensen (con reguladores)

Se preparan una serie de soluciones perfectamente conocidas y dosificadas de los ácidos débiles y sus sales, cuya mezcla produce en cualquier momento, una disolución cuya concentración de iones H es perfectamente conocida. Utilizaremos para ello las fórmulas antes indicadas. Si tenemos una solución cuyos H queremos hallar, bastará que le añadamos un indicador (una gota, por ejemplo, es decir, una cantidad perfectamente medida) y tomará cierta coloración. Basta preparar diferentes mezclas reguladoras, y a cada una echar una gota idéntica del mismo indicador hasta encontrar una que tome un color igual al de la solución desconocida. La concentración de iones H de la mezcla conocida será la misma que la de la que nosotros queremos averiguar.

El método no puede ser, como se ve, más sencillo en teoría, pero en la práctica resulta muy engorroso, y sólo es recomendable como ejercicio muy conveniente para el que quiere iniciarse en estas cuestiones. Pues hay que perder mucho tiempo en preparar con toda precisión las mezclas de ácido débil y su sal, y después comprobar si la concentración calculada es la verdadera, por el método electrométrico cuyo fundamento daremos luego. Este método, como se verá, es el único que da valores absolutos, pues los otros, como se ve, los da por comparación. Trabajando bien siempre coinciden los resultados de ambos procedimientos. Por no tener interés no nos extendemos aquí en datos referentes a preparación de mezclas, elección de indicadores, etc., que cualquier libro especial sobre el asunto da (1).

(1) Pueden recomendarse, sobre todo, el *Praktikum*, de L. Michaelis, antes citado (de este libro existe una traducción española de Jaime Mur), y el libro: *The Determination of Hydrogen Yons*, de W. Mansfield Clark. Baltimore.

Determinación de los H-iones sin reguladores

Se elige un indicador de los llamados de un color, es decir, que siendo incoloros, en presencia de tal o cual concentración ácida o básica toman cierta coloración, así la fenoltaleína que es incolora se torna roja en solución básica. Se debe además escoger el indicador según la acidez o basicidad probable del líquido a investigar; así,

entre	$ph =$	2,2 a	4	escogeríamos el	β-dinitrofenol
»	$ph =$	2,8 a	4,05	»	el α-dinitrofenol
»	$ph =$	4 a	5,5	»	el γ-dinitrofenol
»	$ph =$	5,2 a	7	»	el p-nitrofenol
»	$ph =$	6,7 a	8,4	»	el m-nitrofenol
»	$ph =$	8,5 a	10,5	»	la fenolftaleína
»	$ph =$	10 a	12	»	el amarillo de alizarina.

Al ver este cuadro se nota la importancia de la elección del indicador, pues la fenolftaleína, tomó su máximo color rojo cuando $ph = 9{\cdot}73$, pasa de incoloro a rojo sólo cuando $ph = 8$, es decir, en reacción francamente básica, así que sería inútil emplearla con valores inferiores a 8, pues ya siempre permanecería incolora.

Los nitrofenoles toman color amarillo en la región básica, y los dinitrofenoles amarillo en la región ácida.

Se añaden a 10 cm.³ de la solución a investigar una cierta cantidad perfectamente medida del indicador escogido. Si esta elección está bien hecha debe tomar la solución con él, cierto color pero no debe ser el mínimo (casi incoloro) ni el máximo, debe producirse una tinta media. El color máximo de los indicadores básicos usados lo dan en soluciones al 0,01 n de NaOH, mayores concentraciones de esta base no hacen ya el color más fuerte. Siguiendo en este territorio de *ph* haríamos en varios tubos de ensayo una serie, para ver qué cantidad de indicador se debe añadir a 10 cm.³ de la solución 0,01 n NaOH, para alcanzar el mismo tono que la solución a investigar. Es evidente que para la solución 0,01 n NaOH, necesitaríamos siempre la menor cantidad ya que es la solución que da el más fuerte color. Si la relación entre la concentración de indicador en la solución la llamamos F, el valor h viene dado por la fórmula $h = K\frac{1-F}{F}$, K es una constante indicada en los libros para cada indicador.

Ejercicio práctico. Vamos a hallar el valor *ph* del agua ordinaria de la conducción corriente. Escogeremos como indicador apropiado el m-nitrofenol del que disolvemos en agua destilada 0,3 gr. calentando moderadamente en 100 cm.³. Se vierten en un tubo de ensayo 10 cm.³ del agua a investigar, y a ello se añade 1 cm.³ del indicador antes preparado. Entonces se echan en una serie de tubos de ensayo perfectamente iguales, primero 9 cm.³ de una solución recién preparada de 0,01 n NaOH. Sería lo mismo que la dosificación tomada fuese 0,02 u otra cercana. Entonces se diluye el indicador diez veces en agua, y se toma

este tubo como tipo para comparar el color. Contendrá, como se ve, 11 cm.³ de líquido (1 + 10). Así las cosas, echamos en el primer tubo de la solución de sosa 0,5 cm.³ de la del indicador primeramente preparada; en el segundo, 1 cm.³; y en el tercero, 2 cm.³, es decir, estos valores en una progresión geométrica de cociente 2. Entonces se añade a esto tres tubos la cantidad de solución 0,01 n NaOH, que falta a cada uno, para que en total se alcancen los 11 cm.³ que hay en el tubo del agua a investigar con el indicador. En el primero habrá que añadir 1,5 cm.³ de 0,01 NaOH; en el segundo, 1 cm.³ y nada en el tercero. Se compara la serie con el tubo tipo que sólo lleva agua y se observa que el primero es demasiado claro, el tercero demasiado obscuro, y que el segundo es el que da el tono más aproximado. Hay que mirar siempre los tubos a comparar al mismo tiempo, y contra un fondo blanco (papel, porcelana, etc.) y no demasiado cerca. A veces resulta mejor mirarlos de arriba abajo, es decir en sentido de su longitud. Para alcanzar un dato más preciso se hace la serie más estrecha, o sea que en vez de ser el cociente de la progresión 2 sea 1,2 y hasta 5. Como acabamos de ver que el volumen más apropiado del indicador era 1 cm.³, haremos otra serie en que añadamos a la solución de 0,01 n NaOH y en la forma anterior 0,69 cm.³, 0,83 cm.³, 1 cm.³, 1,2 y por fin 1,44. Comparando veremos que el que lleva 1 cm.³ da el color más exacto, siendo el de 0,83 más claro y el de 1,2 más obscuro que el del agua a investigar. Ahora bien; sabemos que en la solución de sosa encontrada hay 1 cm.³ del indicador diluído diez veces y en la del agua del tubo tipo también 1 cm.³ pero sin diluir. El grado de color F será $\frac{1}{10} : 1 = \frac{1}{10} = 0{,}10$. Para usar la fórmula anterior, miramos en un libro el valor de K que para el m-nitrofenol y para la temperatura del cuarto de trabajo es $4{,}7 \times 10^{-9}$ luego

$$h = 4{,}7 \times 10^{-9} \times \frac{1-0{,}10}{0{,}10} = 42 \times 10^{-9} = 4{,}2 \times 10^{-8},$$

si en vez de h, queremos dar la expresión habitual *ph*, es decir, log h tendremos $\log h = \log 4{,}2 + \log 10^{-8} = 0{,}62 - 8 = 7{,}38$, de donde deduciremos que la concentración de iones H del agua ordinaria de tubería es $ph = 7{,}38$. Este valor es el que se encuentra ordinariamente con una variación de $\pm$ 0,05, sino ha perdido CO_2 por haber reposado demasiado tiempo al aire libre. Por eso debe hacerse este ejercicio en agua recién sacada.

Causas del error con estos métodos

Es necesario tener en cuenta que puede suceder que en las soluciones a investigar haya substancias que se combinen con los mismos indicadores, y que, por lo tanto, varíen su grado de disociación característico y con ello su coloración para un grado dado de concentra-

ción de iones H. Sobre todo los *albuminoides* y los *alcaloides* hay que tenerlos muy en cuenta, pues su presencia puede invalidar en absoluto una medición. Los indicadores recomendados en cada caso son aquellos que, a igualdad de otras circunstancias, producen los menores, errores por esta causa, y así sucede que en la mayoría de los casos concretos tal causa de error es despreciada. Las sales en disociación producen otros iones en el agua además de los H y OH, y estos otros iones no son del todo indiferentes para el tono que adquiere el indicador. Por eso en las soluciones concentradas de una sal, es ésta otra causa de error cuya importancia dependerá de la clase y concentración de la misma y de la especie de indicador que se utilice. Las soluciones fisiológicas de sal producen con los indicadores usuales errores muy pequeños, así que se pueden despreciar, y esta circunstancia es de gran interés, pues permite no tenerla en cuenta para las soluciones fisiológicas o biológicas en general. También para tales líquidos se escogen indicadores adecuados, de tal modo, que esta causa de error y la ocasionada por la presencia de albuminoides, no invaliden las medidas hechas en los líquidos fisiológicos, ya que los resultados coinciden con los obtenidos con los procedimientos electrométricos. Si el mismo indicador tuviese carácter ácido o básico, entonces al diluirse variaría el número de iones H de la solución y sería otra causa de error, pero sabemos que si la solución posee reguladores (y las soluciones biológicas y líquidos orgánicos, en general, ya hemos dicho que están bien regulados) entonces su resistencia a variar el número de iones H, a pesar de añadir un ácido, es grande, y por lo tanto, también será tal causa de error despreciable. En cambio, el agua pura, que está muy mal regulada, se presta mal, y no debe ser objeto de medición de iones Hcon tales indicadores. El agua de río y la de mar, que poseen algo CO_3HNa, están (unido al CO_2 que siempre llevan disuelto) algo mejor reguladas, y en ellas se obtienen resultados más exactos, eligiendo bien el indicador que puede ser el rojo neutral o el rojo fenol.

Método de Walpol

Si el líquido de por sí es coloreado, como la orina, caldos de cultivo, etc., el color propio enmascarará por completo el verdadero tono que hubiese adquirido el indicador, por eso hay que recurrir a un artificio ideado por Walpol. Se necesita un pequeño aparato llamado **comparador de Walpol** (fig. 51). Este consiste en un bloque de madera con cuatro orificios 1, 2, 3, 4 que lo atraviesan de arriba abajo para poder introducir tubos de ensayo en ellos; hay además, otros dos, *a* y *b*, que lo atraviesan horizontalmente, pasando estas oquedades, por los tubos verticales, de tal modo que sirvan para mirar al través los tubos de ensayo introducidos en los primeros. Por detrás del bloque y obstruyendo la abertura de salida de los horizontales, se puede colocar en una corredera un cristal deslustrado o un cristal azul, según convenga, para poder apreciar con más exactitud los tonos. Se toma,

por ejemplo, orina, que si es muy coloreada se diluye 2 ó 3 veces en agua destilada, o en solución al 2 % de ClNa, como la orina tiene buenos « puffer » no se alterará con esta maniobra su valor en *ph*. Se toman 10 cm.³ de ella en un tubo de ensayo, y se le añade cierta cantidad bien medida del p-nitrofenol (generalmente 0,5 — 1 cm.³). El color que tome debe ser claramente visible, pero no demasiado intensamente amarillo, y se introduce el tubo en el orificio 3 ; en otro tubo se toman 10 cm.³ de la misma orina o de su dilución, y se le añade tanta agua como solución del indicador añadimos a aquél, y se mete en el orificio 1 ; en el 4 introducimos un tubo de ensayo con agua en cualquier cantidad, y por fin en el 2 se colocan sucesivamente diferentes tubos, que contengan una serie de diluciones (previamente preparadas, como se dijo al hablar del método por indicadores sin reguladores) de p-nitrofenol en 1/50 n NaOH, cuyos tubos deben contener el mismo volumen total de líquido que los 1 y 3. Entonces se mira por los orificios *a* y *b* hacia el cielo, con lo cual veremos la luz a través de los líquidos colocados en 1, 2, 3, 4 y cambiamos los del 2 hasta que el tono de color observado a través de *a* y de *b* sean idénticos. Notaremos que por el orificio *a*, vemos la mezcla de color de la orina, colocada en 1, más el del indicador colocado en 2 ; y que por el *b* observamos el tubo 3 que lleva mezclados ambos colores, más el 4 cuyo objeto es igualar la masa líquida, para los efectos luminosos, ya que sólo lleva agua clara. Opticamente vemos reunidos y a través de la misma masa líquida, los colores producidos por la orina y por el indicador, los resultados serán, por lo tanto, perfectamente comparables. Suele ser mejor colocar el vidrio azul detrás, pues se aprecian así mucho mejor los tonos. Para la orina normal los valores que se encuentran oscilan entre $ph = 5$ y $ph = 7$, es decir, que es algo ácida. Tal procedimiento puede utilizarse hasta en líquidos algo turbios, por ejemplo, caldos en que han vivido bacterias. Estos, recién preparados, suelen tener de 7 a 7,5, medidos con el m-nitrofenol ; el inoculado con B-coli azucarado, suele dar con el x-dinitrofenol $ph = 5$. Para la sangre, etc., ya el color es tan subido que resultan inutilizables los procedimientos colorimétricos, hay que usar, por lo tanto, los electrométricos.

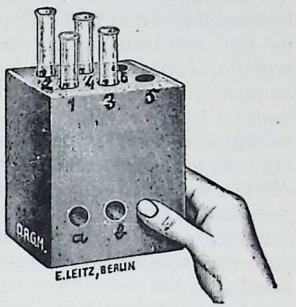


Fig. 51
Comparador de Walpol

Utilización de estos métodos en la práctica

Se deben tener, hechas ya para siempre, con todo género de cuidados, y en tubos cerrados a la lámpara, series como la siguiente

Serie para m-nitrofenol

Tubos n.°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cm.³ del indicador	5,2	4,2	3,	2,3	1,5	1,0	0,66	0,43	0,27
Valor de *ph* escrito en la etiqueta.	8,4	8,2	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,08

En los libros especiales se encontrarán modelos de series a construir con diferentes indicadores. Pero no las copiamos porque en realidad no hacen falta en la práctica, pues ya muchas casas alemanas, francesas, inglesas y yanquis, preparan tales series con toda clase de garantías, en tubos perfectamente calibrados y con las indicaciones necesarias respecto a los valores *ph*. Con ellos vienen las disoluciones adecuadas de los indicadores al comprador, etc., y toda clase de instrucciones que una vez entendidas, los fundamentos que acabamos de dar resultan fácilmente comprensibles y su manejo sumamente sencillo. Indican además en cada caso, por ejemplo para la orina, agua de mar, caldos, etc., los indicadores más a propósito, las cantidades a tomar de ellos y los tubos que habrá que utilizar, así como los cuidados necesarios para evitar las causas de error antes indicadas. Hay personas que tienen verdadera dificultad para apreciar pequeñas diferencias del tono de color, lo cual resulta un grave inconveniente, pues hacen siempre mediciones poco exactas, pero éstas son la excepción, así que la mayoría consigue en seguida resultados aceptables, pero conviene antes de usar tales métodos conocer las aptitudes personales.

Método electrométrico. — Sus fundamentos (Gaskettenmethode de los alemanes)

Ya hemos dicho que es el método fundamental, es el que nos dice de un modo absoluto si las disoluciones preparadas por nosotros con una determinada concentración de iones H la poseen efectivamente; y es, además, el único utilizable en ciertos casos. Pero requiere aparatos ya costosos y cierto aprendizaje, aunque una vez instalado en regla, llega a dominarse en algún tiempo por completo; por todo ello, vamos a dar sólo el fundamento y no los detalles para su uso, que el lector podrá encontrar en los catálogos de las casas constructoras, o en los libros citados ya en este capítulo respecto a la determinación de iones H. Para normas acerca del uso del electrómetro capilar, de las cajas de resistencia, etc., será muy útil también el libro de Ostwald-Luther titulado: *Physikochemische Messungen.*

Principio del método

Sabemos que todo electrodo metálico, al ser sumergido en una disolución en la que existen iones de su misma naturaleza, adquiere frente a ésta cierto potencial eléctrico que depende: 1.°, de la naturaleza del electrodo; 2.°, de la naturaleza del medio disolvente; 3.°, de la concentración de la solución en aquellos iones que el electrodo pueda originar, es decir, si el electrodo es plata, de la concentración en la solución de iones Ag., si el electrodo fuese el hidrógeno de la concentración de la solución en iones H, y aquí está el fundamento del método, *pues midiendo tal diferencia de potencial podremos averiguar la concentración de la solución en iones H;* 4.°, de la temperatura. En todas las experiencias fisiológicas es el agua el medio disolvente, de tal modo que para nuestro fin, podemos considerar este medio como constante, y dejar de tenerlo en cuenta. Respecto a las otras variables, de las que depende la diferencia de potencial (que es lo que a nosotros nos interesa medir), ha dado Nernst la fórmula que las liga cuando el electrodo origina iones monovalentes. Esta fórmula es

$$E = \frac{R}{F} T \ln \cdot \frac{P}{p} \text{ Volt.}$$

Aquí E es la fuerza electromotriz o diferencia de potencial; R, la constante de los gases (véase capítulo sobre Osmosis, etc.); F, significa el número de unidades de electricidad (culombios) que lleva 1 mol. de un ion monovalente (96.540); *ln*, quiere decir logaritmos naturales; T, es la temperatura mas 273°; P, es una constante característica del electrodo metálico, que Nernst denomina su tensión electrolítica; y p, es la presión osmótica en la solución del ión de la misma naturaleza que el electrodo metálico. Si nosotros queremos expresar aquella fórmula en los logaritmos decimales que son los más usuales sabemos quedaría transformada así: $E = \frac{R}{F} \cdot T \cdot 0{,}4343 \log \frac{P}{p}$. Como la constante $\frac{R}{F} \cdot 0{,}4343$ tiene, según Nernst, el valor $= 0{,}0001983$, podríamos escribir de una vez para siempre la fórmula anterior, expresando en voltios la diferencia de potencial

$$E = 0{,}0001983 \cdot T \cdot \log \frac{P}{p} \text{ Volt.}$$

Medida del potencial

Como este es, según acabamos de decir, el nudo del problema, vamos a detenernos en él. Como nosotros no poseemos aún un método general para la medida de un potencial único, sino que la regla es que sólo podamos medir *diferencias entre dos potenciales*, nuestro asunto consistirá en medir la diferencia de potencial entre dos pares eléctricos, uno será el que es objeto de nuestra investigación, y el otro será un par elegido de una vez para siempre como término de comparación o unidad, de potencial perfectamente conocido y que llamaremos *par* o *electrodo normal*. Si entonces cerramos nosotros el

circuito entre estos dos pares (el desconocido y el normal), la fuerza electromotriz de este circuito será precisamente igual a la diferencia de potencial entre ambos electrodos. Como nosotros queremos medir concentraciones de iones H, y no poseemos hidrógeno sólido metálico para utilizarlo como electrodo, elegiremos en substitución, un metal cargado de hidrógeno. Un electrodo de esta condición lo podemos obtener, tomando uno de platino y saturándolo de hidrógeno gaseoso. Semejante electrodo se comporta exactamente como si fuese de hidrógeno metálico, lo mismo que una amalgama de mercurio y de zinc se comporta electromotóricamente como si fuese sólo de zinc. Como segundo electrodo elegimos nosotros igualmente uno de hidrógeno, representado por un líquido que llevará disuelto este hidrógeno en iones libres, y éstos a una presión osmótica perfectamente conocida p. El potencial del primer par sería $E = 0{,}0001983\ T \log \frac{P}{p}$; y el del segundo $E = 0{,}0001983\ T \log \frac{P}{po}$ y por consiguiente, la fuerza electromotriz del circuito formado por ambos sería :

$$E = 0{,}0001983\ T \log \frac{P}{p} - 0{,}0001983\ T \log \frac{P}{po}$$

o sea

$$E = 0{,}0001983\ T \log \frac{P \times po}{p \times P} = 0{,}0001983 \log \frac{po}{p} \text{ Volt.} \qquad (3)$$

Una cadena cuyos ambos electrodos sólidos están formados por el mismo metal, y cuyo poder electromotor sólo depende de la diferencia de la presión osmótica, o sea de la concentración de los iones disueltos en los dos otros electrodos líquidos de ambos pares, la llamaremos : *cadena de concentración* (Koncentrationskette). Como se ve por la fórmula (3) desaparece la constante P y entonces la fuerza electromotriz de tal cadena depende sólo de las diferencias entre las presiones osmóticas de los iones disueltos. *Cadena de concentración* : Como en una disolución acuosa diluída, la presión osmótica de una substancia disuelta es proporcional a su concentración, se puede sustituir la relación entre las presiones por la de concentraciones y escribiríamos

$$E = 0{,}0001983\ T \log \frac{Co}{C} \text{ Volt.} \qquad (4)$$

Aquí C significa la concentración de iones H de la solución desconocida, y Co la del electrodo normal. Este se ha elegido tomando como unidad la solución que contiene 1 gr. H-iones por litro, que como dijimos al principio del capítulo, no es como parece debiera ser una disolución normal de ClH, sino 1,25 n. En estas condiciones la fórmula (4) se transforma así :

$$E = 0{,}0001983\ T \log \frac{1}{C} \text{ Volt.}$$

$$E = -0{,}0001983\ T \log C \text{ Volt.} \qquad (5)$$

Si nosotros queremos ahora resolver nuestro problema, es decir, hallar la concentración de C iones H de una solución desconocida, entonces formaríamos una cadena de concentración cuyos dos pares serían : *uno el normal* constituído por el electrodo de platino cargado de H, y la solución normal de iones H en agua ; y el segundo par sería el electrodo de platino cargado de H como en el primero, y la solución sería la desconocida. Si llamamos E a la fuerza electromotriz de tal circuito o cadena, deduciríamos $\log C = -\frac{E}{0{,}0001983 \cdot T}$. Hallamos, pues, el logaritmo de la concentración de iones H buscada, y en la tabla de logaritmos hallaremos su número correspondiente. Ahora bien; ya sabemos que en las soluciones fisiológicas las concentraciones de iones H son siempre menores que en la normal, o sea inferiores a 1, el logaritmo será, pues, siempre negativo, y por lo tanto —log C resultará positivo. Ya sabemos que Sorensen lo llamó *ph*. Por consiguiente,

$$ph = -\log C = \frac{E}{0{,}0001983 \cdot T}.$$

Ejemplo : Supongamos que la diferencia de potencial E, entre la solución desconocida y la del electrodo normal, es de 0,5 Volt. a una temperatura de 27° que en temperatura absoluta es (27 + 273 = 300°)

$$ph = \frac{0{,}5}{0{,}0001983 \cdot 300} = 8{,}40.$$

Hallando el número correspondiente a tal logaritmo, como indicábamos al principio del capítulo, nos daría para

$$H = 3{,}91 \times 10^{-9} = 0{,}000.000.00391 \text{ normal H.}$$

No queremos extendernos más, sobre consideraciones teóricas respecto a causas de error y medios prácticos para evitarlas, ni a detalles sobre construcción de los electrodos, etc. En cualquiera de los libros citados de Michaelis, Ostwald-Luther, Schade, etc., encontrará el lector cuantos datos prácticos necesite. Unicamente parece oportuno antes de acabar, decir dos palabras sobre los aparatos usados en la práctica.

La forma más usada de los electrodos o pares es la de tubo (fig. 52), o la de pera (fig. 53). Ambos consisten esencialmente en recipientes donde se introduce el líquido a investigar, que se continúa mediante un conductor c, con el resto de la cadena eléctrica. El electrodo sólido de este par está formado por un hilo de platino (a) previamente preparado, pues va recubierto de negro de platino conductor del hidrógeno gaseoso. El par antes descrito como norma, por razones prácticas se sustituye por un electrodo llamado de calomelanos, cuya construcción (aparte de la armadura de cristal que se compra ya hecha) se realiza en los laboratorios, siguiendo con todo detalle las prescripciones prácticas indicadas en los libros citados anteriormente.

Luego estos dos pares que hacen de electrodos, por decirlo así, de la cadena de concentraciones que vamos a formar, se ponen en comunicación eléctrica mediante un recipiente que contiene una solución saturada de KCl. Suelen hacerse además las uniones entre esta solución y los dos electrodos mediante tubitos de vidrio acodados rellenos de gelatina saturada de KCl. Todos estos dispositivos tienen por objeto evitar la formación de potenciales en las superficies de contacto entre los diferentes líquidos existentes o entre éstos y los hilos conductores metálicos, etc., que serían grandes causas de error. Por fin, el aparato completamente montado está representado en la figura 54 y el esquema explicatorio del mismo en la figura 55. Como se ve en él, existen tres generadores de potencial y tres circuitos. Un generador es $E x$ que es de potencial desconocido que queremos averiguar. Vemos en él el electrodo o par de calomelanos C, y el electrodo que contiene el líquido a investigar g, ambos unidos entre sí por la cubeta que contiene una solución saturada de KCl (en la figura existen otros dos electrodos tubulares de los que se puede prescindir), el circuito de éste par se cierra exteriormente según indican los números 3. Un segundo circuito es el marcado con los 2, y está formado por un elemento eléctrico o par construído especialmente para que dé con todas garantías un potencial de 1.019 Volt. y es el E_1. Y el tercer circuito es el formado por el acumulador E_2 y el conjunto 1,1, etc. Además, existe en éste el reóstato R y las cajas de resistencia W_2 W_1. Y en el conductor común a los circuitos 2 y 3 existe un galvanómetro muy sensible para apreciar los menores cambios de la corriente, los ordinarios de aguja no pueden usarse aquí, porque las corrientes a investigar tienen escasísima intensidad y no moverían la aguja, por eso se sustituyen por un electrómetro capilar K (fig. 56) (de sencillo manejo y construcción) (1). Hay además interruptores para lanzar o cortar las corrien-

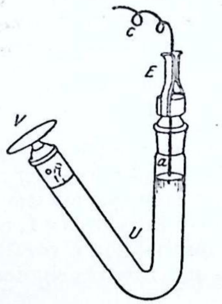


FIG. 52. Electrodo en forma de tubo acodado

El par se forma en el contacto del hilo de platino *a*, recubierto de negro de platino saturado de H gaseoso, con el líquido del tubo cuyos iones H queremos determinar. El circuito se cierra mediante el hilo c y otro que podría introducirse sustituyendo el tapón *V*, pero como en el contacto de este hilo con el líquido se podría producir un potencial, se sustituye el hilo por un tubito de gelatina solidificada hecha conductora saturándola de ClK

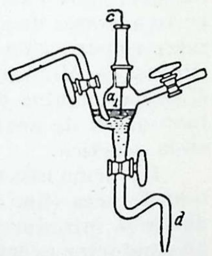


FIG. 53. Electrodo en forma de pera

(Aquí el circuito se cierra en *c* y con *d*)

(1) Este electrómetro es el más utilizado en los laboratorios. Por eso lo citamos; pero también se emplean con este objeto otros galvanómetros suficientemente sensibles. Ver libro antes citado de W. MANSFIELD CLARK.

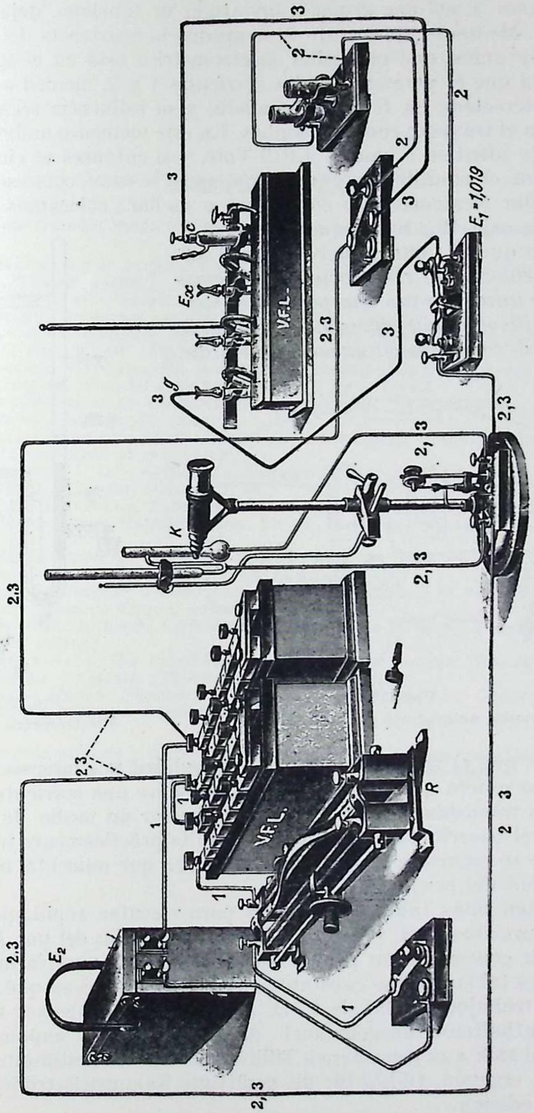


FIG. 54. Dispositivo completo para la medición de iones-H por el procedimiento electrométrico

tes de los diferentes circuitos según convenga. Se comienza por abrir el conductor 3, así que el par a investigar no funciona, dejando sólo los 1 y 2. Mediante el reóstato R se gradúa la resistencia del 1, hasta que observamos que el capilar electrométrico está en el 0, lo cual nos indica que el potencial de las corrientes 1 y 2, merced a la resistencia intercalada en R se ha igualado, y su influencia recíproca ya es nula en el trayecto común a ambos. En este momento ambos poseen un voltaje idéntico e igual a 1.019 Volt. y si entonces se cierra el 3, se romperá el equilibrio porque su potencial se suma como se ve al 2, y el capilar electrométrico comenzará a oscilar ; colocamos resistencias en la caja W_1, hasta que vuelva al 0, indicando que el voltaje vuelve a ser el anterior. *Y entonces la resistencia que hayamos tenido que introducir nos dan por cálculo sencillo los milivoltios que expresan el potencial de la cadena de concentración que queremos medir.*

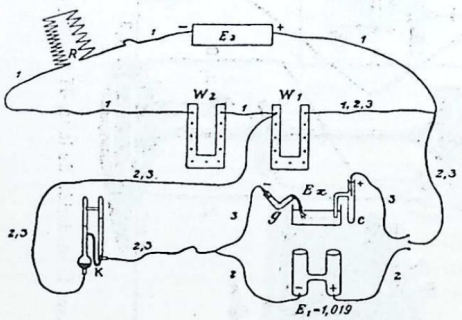


FIG. 55
Esquema aclaratorio de la figura 54

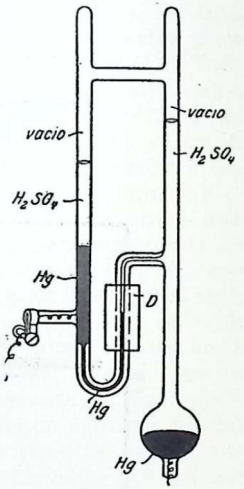


FIG. 56
Electrómetro capilar

Claro que el único circuito que en realidad nos interesa es el 3, pero como quiera que el generador $E\,x$ produce una corriente pequeñísima en intensidad y voltaje, hay que buscar un medio de medirlo evitando el hacerlo directamente que resulta prácticamente imposible y por eso se recurre a la disposición descrita que aumenta mucho la sensibilidad del conjunto.

Existen unas tablas muy útiles para ejecutar rápidamente los cálculos precisos, una vez obtenidos los milivoltios del par $E\,x$ para obtener la concentración *ph* del líquido, objeto de nuestra investigación. Tales tablas de uso constante en los laboratorios en que se realizan estos trabajos, son las de P. D. ARVO YLYPO, tituladas: «Ph. Tabellen enthaltend ausgerechnet die Wasserstoff — exponenten — Werte die sich aus gemessenen Millivoltzahlen bei bestimmten Temperaturen ergeben. Gültig für die gesättigte Kalomelelectrode ». 1922. Segunda edición.

BIBLIOGRAFÍA

Lista de tratados modernos importantes sobre coloides en general (1)

1907. AV. KORANYI y P. F. RICHTER, *Physikalische chemie und Medizin.* Leipzig. (G. Thieme, editor.)
1908. *Les colloides en Biologie et en Therapeutique*, G. Stodel. París.
1911. WEIMARN, *Grundzüge der Dispersoid chemie.* Dresden.
1917. ANTONIO DE GREGORIO ROCASOLANO, *Estudios Químico-físicos sobre la materia viva.* 2.ª ed. (Tip. de Gregorio Casañal, Zaragoza.)
1921. WOLFGANG OSTWALD, *Die Welt der Vernachlässigten Dimensionen.* Dresden y Leipzig. (Theodor Steinkopff, editor.) 5.ª y 6.ª ed.
1922. WOLFGANG OSTWALD, *Grundriss der Kolloidchemie.* 7.ª ed. Dresden y Leipzig. (Theodor Steinkopff, editor.)
1922. RICHARD ZSIGMONDY, *Kolloidchemie.* 4.ª ed. Leipzig. (Otto Spainer, editor.) Está traducido al castellano.
1922. H. BECHHOLD, *Die Kolloide in Biologie und Medizin.* 4.ª ed. Dresden y Leipzig. (Theodor Steinkopff, ed.).
1922. RAPHAEL LIESEGANG, *Kolloidchemie.* 1914-1922. (Theodor Steinkopff, editor.)
1922. H. FREUNDLICH, *Kapillarchemie.* 2.ª ed. Leipzig. Akademische Verlagsanstalt.
1922. H. HANDOWSKY, *Leitfaden der Kolloidchemie für Biologen und Mediziner.* Dresden y Leipzig. (Theodor Steinkopff, editor.)
1922. AUGUSTE LUMIÉRE, *Theorie Colloidale de la Biologie et de la Pathologie.* París. (Etienne Chiron, editor.)
1923. ERNST JOËL, *Klinische Kolloidchemie.* Prefacio de K. SPIRO. (Theodor Steinkopff, editor.)
1923. DR. H. SCHADE, *Die Physikalische chemie in der inneren Medizin.* 3.ª ed. Dresden y Leipzig. (Theodr Steinkopff, editor.)
1926. RUDOLPH HÖBER, *Physikalische chemie der Zelle und der Gewebe.* 6.ª ed. (Leipzig. Wilhelm Engelmann, editor.)

(1) En cada capítulo y cuando el caso lo requiere, hacemos mención del libro especial o revista donde el lector podrá ampliar sobre un asunto dado.

SEGUNDA PARTE

FERMENTOS

Capítulo I

Generalidades sobre los fermentos, sobre su obtención y sobre su estudio

¿Qué es lo que queremos decir cuando hablamos de fermentos? Sabemos todos que los alimentos que introducimos en el tubo digestivo se transforman considerablemente en el tiempo relativamente corto que dura la digestión.

Pasan compuestos de gran complicación molecular a otros de estructura química mucho más sencilla, y estas transformaciones se verifican a la temperatura del cuerpo, con relativa rapidez y sin gran aparato.

Por el contrario, cuando queremos reproducir en el tubo de ensayo tales reacciones, sometiendo los mismos alimentos a la acción de ácidos o bases, necesitamos echar mano de concentraciones, temperaturas y tiempos muy superiores a los que caracterizan los cambios químicos de la digestión.

En el caso del estudio en el tubo de ensayo atribuímos tales cambios a la acción de los ácidos o bases, o sea de los iones de hidrógeno o hidroxiliones que hemos hecho actuar sobre los alimentos ; en el caso de la digestión sabemos que la causa de tales modificaciones radica en los jugos con que se mezclan los alimentos en el tubo digestivo, suponiendo que en estos jugos hay *algo*, que no es sólo un ácido o una base, que es el agente de tales transformaciones, y a este algo llamamos fermento. Expondremos después con más detalle las hipótesis que hoy existen para explicar lo que son los fermentos, pero ahora nos parece oportuno indicar desde luego

Las orientaciones que se advierten entre los investigadores acerca del modo de obrar de los fermentos

Lo primero que se nos ocurre al hablar de ellos, puesto que las fermentaciones son transformaciones químicas, es que se trata de substancias cuya acción depende de su composición química. En tal creencia si queremos llegar a conocer la esencia de la acción fermentativa, tendremos que empezar por aislar en estado de pureza los fermentos para poder descubrir su composición y estructura químicas.

Pero en otros muchos casos, por estar éstos dentro de las células tenemos que empezar por sacarlos nosotros de allí, bien sea por extracción mediante líquidos, es decir, dejando esas células, tejidos u órganos algún tiempo en agua, glicerina o alcohol débil para que los fermentos se difundan a través de las membranas y pasen a los líquidos exteriores; teniendo en cuenta que siempre que se pueda debe utilizarse la glicerina que daña menos a los fermentos y los conserva mejor; o en otros casos, es preferible que los libertemos nosotros rompiendo las membranas celulares en que están contenidos. Esta ruptura puede hacerse mecánicamente, por ejemplo, reduciendo a picadillo, bien sea a mano o con máquinas (fig. 57), trozos del órgano o tejido, por ejemplo: hígado, riñón, mucosa estomacal, intestinal, etc., y prensándolo después con prensas potentes como la de Büchner (figura 58), etc. Se puede prensar el picadillo directamente o mezclándolo con una masa formada de arena y agua, o arena y glicerina, alcohol, etc.

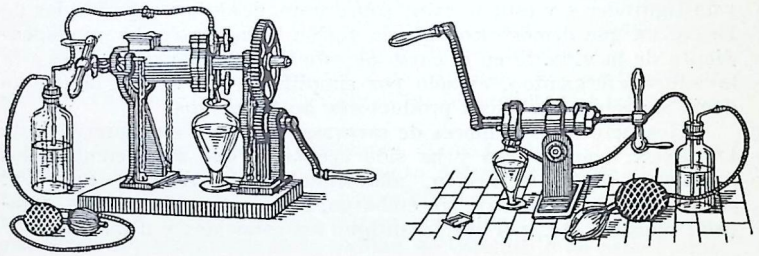


Fig. 57. Prensas trituradoras de tejidos de Latopic

Puede también provocarse la ruptura celular por el calor, por ejemplo, dejando la levadura en capas delgadas o en trocitos sobre papel filtro, cristal, etc., a la temperatura ambiente para que se seque y acabando esta desecación mediante aparatos adecuados como el de Faust, en los que se pueden someter los objetos a corrientes de aire caliente, y si se quiere, calentando, por fin, la levadura a 60°-70°. En este estado se puede guardar la levadura en frascos de cristal y lugares secos mucho tiempo, a la temperatura ambiente, sin que sus fermentos se alteren, y cuando queramos extraerlos bastará colocar este producto desecado en agua, en un álcali débil o en glicerina, etc. y salen fácilmente al líquido extractor, debido a que las membranas celulares están muy dañadas a causa de la desecación.

En el *Physiologisches Institut*, de Halle, secábamos, como queda indicado, durante varios días, la levadura comprada en los comercios, panaderías, etc., los trocitos perfectamente secos, los molíamos y guardábamos este polvillo en frascos de cristal cerrados. Cuando nos hacía falta, cogíamos 30 gr. de ello, lo mezclábamos con 90 c. c. de agua y se dejaba empapar dos horas, al cabo de las cuales se revolvía

la mezcla en un mortero durante algún tiempo y luego se filtraba a través de papel filtro. La filtración es muy lenta, por lo cual conviene realizarla durante una noche o más, dejando todo en el frigorífico a 0°. Así se obtiene un líquido dorado que encerraba, a juzgar por su acción, bastante cantidad de polipeptidasa, invertasa, etc. Este líquido, sin más, lo utilizábamos en nuestros trabajos siempre que deseábamos saber si tal o cual nuevo polipéptido obtenido sintéticamente por nosotros era atacable por los fermentos o no, o si queríamos trabajar con invertasa.

Para estudios de fermentos en bacterias se ha empleado la congelación mediante aire líquido para solidificarlas, y en este estado triturarlas mecánicamente en morteros de acero. Por último, se pueden obtener las enzimas celulares dejando que las células se descompongan por sus propios fermentos (autolisis), y entonces éstos salen al exterior y los podemos utilizar.

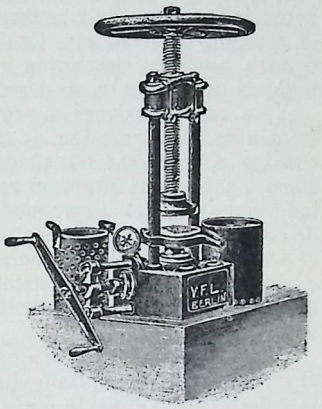


Fig. 58. Prensa de Buchner

Es claro que todos estos procedimientos admiten muchas variaciones que se pueden encontrar descritas en libros especiales para cada caso, pero en el fondo se reducen a los tres citados, a saber: 1.°, recoger líquidos que ya contienen los fermentos segregados; 2.°, extraerlos del interior de las células por medio de líquidos disolventes; 3.°, romper la envoltura celular y recoger los jugos libertados que contienen las enzimas.

Al final de cualquiera de estos procedimientos nos encontramos con un líquido que, además del fermento que buscamos, contiene otros, y una porción de sales y de compuestos orgánicos y minerales que será preciso eliminar mediante la

Limpieza de los fermentos. Los fermentos son coloides y, por lo tanto, por *diálisis* los podemos separar de las sales e impurezas que sean dializables. A veces, sin embargo, con este procedimiento se separan los *cofermentos* y separadas estas substancias necesarias para la acción de los fermentos pierden éstos su actividad. Otras veces al dializarlos se difunden en parte, según el tamaño de sus micelas y las condiciones de la membrana, o se perjudican algo, con lo cual el líquido primitivo pierde en energía fermentativa.

Usase, también, para limpiar los fermentos el procedimiento de *precipitación*, por medio del alcohol, acetona, éter, etc. El precipitado contiene los fermentos que deseamos, acompañados de muchos albuminoides extraños, por lo cual conviene recoger este precipitado por filtración y redisolverlo en agua, se separa lo insoluble, y se vuelve

a precipitar lo disuelto, consiguiendo así separar los fermentos de muchas impurezas de naturaleza albuminoidea. Se debe evitar el exceso de contacto con el alcohol sobre todo, que perjudica mucho.

Un método importante es el basado en la precipitación de los fermentos cuando sus disoluciones, sobre todo si son débilmente ácidas se saturan con sales neutras ; así, por ejemplo, algunos precipitan con el cloruro sódico, y otros con el cloruro amónico. Con el sulfato amónico a saturación precipitan todos y algunos a media saturación. El precipitado se recoge por filtración, se vuelve a disolver en la menor cantidad posible de agua y esta solución se dializa para separar el sulfato amónico por completo, obteniendo, por fin, el fermento por evaporación de su solución en el vacío, cuidando mucho de no calentar demasiado ni mucho tiempo o en vez de evaporar precipitando por el alcohol, acetona, etc. Con este método, sobre todo utilizando el sulfato amónico precipitan con los fermentos los albuminoides y muchos productos de su descomposición.

En otras ocasiones se provoca en la soluciones que contienen los fermentos, la formación de precipitados indiferentes que arrastran consigo a aquéllos; así, añadiendo alternadamente fosfato sódico y cloruro cálcico, se forma un precipitado de fosfato cálcico que arrastra los fermentos ; del mismo modo mediante la adición de una disolución de colesterina en acetona o alcohol, precipita la colesterina arrastrando el fermento. También se pueden utilizar los ácidos grasos elevados, en soluciones alcalinas, precipitándolos mediante ácidos inorgánicos en cantidades calculadas según la alcalinidad de la solución del ácido graso.

Es claro que en todos estos casos es necesario después separar el fermento del precipitado que lo arrastró, sea éste el fosfato sódico, la colesterina o el ácido graso, etc., y esto, como se comprenderá, por operaciones diferentes, según los casos, cuyo detalle se encontrará en las obras especiales.

Para separar de las soluciones de fermentos albuminoides extraños, se añade sosa hasta hacer aquéllas débilmente alcalinas, después se tratan con disoluciones diluídas de acetato de uranio, los albuminoides precipitan y se separan por filtración de los fermentos. Conviene lavar varias veces con poca agua el precipitado formado, para recoger por disolución el fermento que pudiera llevar adherido, y esta agua de los lavados se junta con lo filtrado anteriormente.

Procedimiento biológico. Effront [1] utilizaba el siguiente medio que perfeccionaron Fraenkel y Hamburg. Hacía fermentar una solución que contiene hidratos de carbono y albuminoides por medio de la levadura. Esta acaba por consumir del todo los dos principios inmediatos citados, pero no la amilasa que ella misma segrega y que queda allí ; otros fermentos proteoclásticos desaparecen también por ser utilizados como alimento para la levadura.

[1] Effront, J., *Les Enzimes et leurs applications*. París, 1899.

Limpieza de fermentos por absorción y adsorción [1]. Wood [2] describe el siguiente método. Con trozos de papel filtro se absorbe la solución que contiene el fermento, se seca este papel rápidamente en una corriente de aire caliente y se deja luego quince o veinte minutos en agua. El fermento se disuelve así fácilmente en ésta, mientras que las porciones coloidales de albuminoides quedan fuertemente adheridas a la celulosa.

Por último, tienen mucho interés los métodos de purificación de fermento basados en la *adsorción* por haber sido escogidos por Euler y sobre todo por Richard Willstätter y sus discípulos al intentar obtener la sacarosa pura. Han conseguido separar de los fermentos muchos componentes considerados hasta entonces como formando parte de ellos. Willstätter utilizaba la aptitud que poseen determinados *adsorbentes* de retener en su superficie la sacarasa o sus impurezas según le convenía, y después de separadas ambas por filtración, variando las condiciones, hacía que el adsorbente soltase el fermento. Ha conseguido obtener las sacarasas, más enérgicas conocidas, lo cual quiere decir que hasta ahora son los productos conseguidos más limpios y libres por completo de albuminoides ya que no daban ninguna de las reacciones de éstos. Lo cual nos indica que la sacarasa misma no es de naturaleza albuminoidea, con la opinión en contra bastante generalizada.

Métodos generales de investigación de fermentos

Dos objetivos muy diferentes nos podemos proponer al trabajar con ellos: 1.°, podemos utilizar los fermentos como medio para conseguir un fin, bien sea industrial o científico ; 2.°, podemos, por otra parte, considerar a la acción fermentativa como fin en sí, intentar descubrir su esencia, es decir, tratar de averiguar si los fenómenos fermentativos pueden ser comparados y aun asimilados a procesos químicos conocidos más o menos, por ejemplo, si se trata aquí de simples catálisis, etc.

En este caso, los productos finales, las reacciones químicas de paso, etc., no nos interesan más que como medio de descifrar el enigma del problema esencial ; ver si por su análisis o estudio nos permiten darnos cuenta de la cinética de la reacción, si ésta es provocada, o simplemente acelerada o retardada por los fermentos, si la podemos reunir en una ley, representar por gráficas ya conocidas, etc.

En el primer sentido, como decíamos, se hace uso de los fermentos muy frecuentemente en la industria, en los laboratorios, etc. Nos interesa entonces el producto final o algunos de los de tránsito, y pueden

[1] Adviértase que *adsorción* quiere decir condensación de la substancia adsorbida en la superficie del adsorbente, y *absorción* existe cuando la substancia absorbida penetra *dentro* de la que absorbe. La adsorción es un fenómeno muy importante en química coloidal, y sobre todo es para la cuestión de los fermentos de gran trascendencia, como se verá en el capítulo II.

[2] Josef T. Wood, *Journ. Soc. Chem. Med.* 37. 313 (1918).

ser accesorios el tiempo y marcha de la reacción, ejemplo: el vinatero que hace fermentar el mosto, el panadero que añade levadura a la masa, el cervecero, etc., utilizan los fermentos con este objeto, les interesa sólo la obtención por su medio del producto final que elaboran.

También con puros fines científicos se utilizan en este sentido los fermentos para obtener algunos productos en química orgánica o separar unos de otros, como veremos luego.

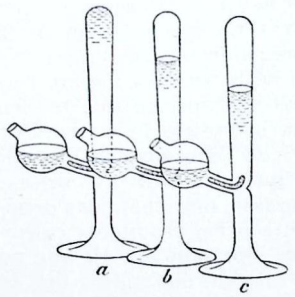


FIG. 59

Tubos de fermentación para el análisis cuantitativo del azúcar

a, tubo con agua y levadura solo (no debe haber fermentación ni por lo tanto desprendimiento de gas en el control); *b*, lleva agua, levadura y azúcar al 1 %; *c*, agua, levadura y la solución a analizar

Conocidos de todos son los establecimientos daneses, franceses, etcétera, que se dedican exclusivamente a la crianza de levaduras puras, y que venden fermentos seleccionados para obtener tal o cual clase de mantequillas, quesos, vinos, etcétera.

Se utilizan también en los laboratorios los fermentos para distinguir algunos productos de otros, por ejemplo, los azúcares fermentescibles de los que no lo son, y hasta para realizar la determinación cuantitativa de algunos azúcares. Esto se realiza en los llamados tubos de fermentación (fig. 59). Allí se coloca la disolución del azúcar que queramos dosificar, se añade levadura y el anhídrido carbónico que se forma, se almacena en el extremo del tubo graduado. Por el número de centímetros cúbicos que ocupa y con el auxilio de tablas a propósito se puede averiguar la cantidad de azúcar, en gramos, disuelta en el líquido.

Más que entrar en estos detalles nos interesa pasar a hablar de

Métodos de estudio de las fermentaciones en sí. Cinética de las fermentaciones

Como hemos indicado, es hoy día objeto de preocupación constante de muchos investigadores, la resolución de la cuestión ¿cómo obran los fermentos? o de ¿por qué se realizan las fermentaciones? Y entre otros modos de atacar este problema, se ha creído oportuno seguir las reacciones químicas que se verifican en los procesos fermentativos, variando una y otra vez sus condiciones, para ver, como dijimos, si podían descubrirse leyes propias, o analogías con procesos físico-químicos ya conocidos, por ejemplo, con reacciones monomoleculares, con procesos catalíticos, de adsorción, etc. Pero para esto hay que conocer, por decirlo así, cuantitativamente, las reacciones en cada momento, es decir, estudiar la cinética de la reacción en cada

caso. Durante la fermentación tienen lugar cambios físicos y químicos en el medio que fermenta, y así, según los casos, nos convendrá seguir las reacciones a través de las variaciones de uno u otro orden. Pondremos ejemplos variados.

Ejemplo de fermentaciones seguidas estudiando el curso de los cambios químicos o reacciones que allí se verifican. Si se tratase de seguir la descomposición de las *grasas* o de otros *esteres* por los fermentos lipasa y estarasas, respectivamente, como en ambos casos tiene lugar una separación de ácidos por un lado y alcoholes por otro (en el caso de las grasas, los ácidos grasos correspondientes y la glicerina), podremos seguir rápidamente la reacción estudiando en iguales espacios de tiempo las variaciones en la *acidez* del líquido que fermenta.

Si el objeto de nuestra investigación fuese una *substancia nitrogenada*, por ejemplo, un polipéptido, sea la leucil-glicina cuya descomposición por la polipeptidasa es:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH - CH_2 - \underset{\underset{\text{Leucil-glicina}}{\overbrace{}}}{\underset{\displaystyle NH_2}{CH}} - CO - NH - CH_2 - COOH + H_2O = \text{ + agua =}$$

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH - CH_2 - \underset{\underset{\text{Leucina}}{\overbrace{}}}{\underset{\displaystyle NH_2}{CH}} - COOH + \underline{NH_2} - CH_2 - COOH \quad \text{+ Glicoeola}$$

En este caso utilizamos el método de SORENSEN para analizar el nitrógeno amínico, es decir, el N en el grupo $\underline{NH_2}$; en el primer miembro de la reacción encontraríamos una vez sólo el N en el grupo $\underline{NH_2}$, y, en cambio, después de verificada la hidrólisis encontramos dos veces el grupo $\underline{NH_2}$, la dosificación del N amínico acusaría un aumento en el curso de la fermentación, hasta alcanzar un valor doble que al principio, cuando todas las moléculas se hubiesen hidrolizado. Después, bien uno de los componentes ópticos de la leucina, la forma destrógira D o levógira L o la glicocola podría ser atacada, y al destruirse poco a poco iría bajando el valor del N en el grupo $\underline{NH_2}$. Es importante este método, pues nos permite seguir el desmembramiento de las grandes moléculas albuminoideas, o de las grandes cadenas de polipéptidos y la descomposición de sencillos amino-ácidos.

Si se tratase de *hidratos de carbono*, por ejemplo, hidrólisis de la sacarasa

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = O_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

podríamos utilizar el licor de FEHLING para seguir el curso de la reacción, midiendo el poder reductor que aparece en cuanto empieza la

descomposición de la sacarasa en glucosa y levulosa, aun cuando en este caso es más cómodo el método óptico, que pasamos a indicar ahora.

Ejemplo de fermentaciones seguidas estudiando el curso de los cambios físicos, o físico-químicos del substracto. *Método polarimétrico.* En el caso citado de la hidrólisis de disacáridos, más cómodo que el procedimiento químico sería seguir en el polarimétrico (fig. 60) las

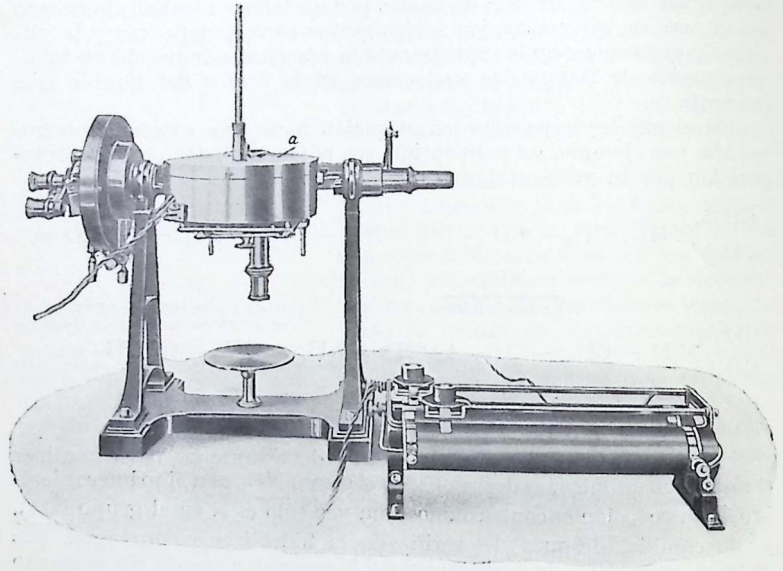


FIG. 60. Polarímetro

Es como los corrientes, sólo que lleva el tambor *a*, calentado eléctricamente, y en el que se pueden colocar 5 ó 6 pruebas para seguir la marcha de la fermentación a temperatura constante; el tambor *a* es giratorio

variaciones en el poder rotatorio. Y veríamos que la solución a fermentar que al principio era dextrógira disminuye en este valor y pasa a levógira. Combinando este valor del poder rotatorio con el del reductor obtendríamos el «factor óptico», de CROFT HILLS, que no es sino la relación en cada momento de la fermentación, entre ambos factores.

El método óptico se emplea frecuentemente para seguir la marcha de muchas fermentaciones proteolíticas; especialmente en los estudios de descomposición de polipéptidos se usa casi siempre. Ya indicaremos luego sus ventajas.

También se emplea en los casos de descomposición de glucósidos por emulsinas.

Variaciones de la tensión superficial. RONA y MICHAELIS han utilizado esta variación en la tensión superficial, medida por el número de gotas que la pipeta cuentagotas da en la unidad de tiempo para seguir la marcha de la descomposición de la tributirina por los fermentos lipásicos del suero sanguíneo (1).

Variaciones en el color (Véase descriptiva de fenolasas y oxidasas.)

Variaciones en la viscosidad. Se ha usado en el caso de fermentaciones de albuminoides. El procedimiento es el que se describe en los libros de patología del tubo digestivo para delatar la pepsina, tripsina, etc. Y consiste en llenar los tubos llamados de METT, de albúmina, gelatina, fibrina, etc., líquidas, y provocar su coagulación. Estos tubitos tienen 0,8 a 2 mm. de diámetro interior y 20 a 40 cm. de altura. Por los fermentos se liquidan otra vez estas substancias, y la marcha de la licuación parece que debería indicar la de la fermentación. Pero estudiando este procedimiento, comparándolo con los métodos químicos, análisis del nitrógeno, por ejemplo, o con las variaciones de la conductibilidad eléctrica, etc., se ha visto que la viscosidad alcanza un valor máximo ya constante, cuando los otros métodos demuestran que la hidrólisis continúa aún activamente. Por esto ha perdido su valor en estudios de cinética de la fermentación; pero lo sigue siendo en clínica, más que todo, para denunciar la existencia de fermentos proteolíticos en un jugo y para comparar la riqueza de dos o varias soluciones o jugos en dichas enzimas.

Variaciones en el número de moléculas. Como casi en todas las fermentaciones, existen tales variaciones; en las descomposiciones, por ejemplo, una molécula produce varias, parece que podía haberse utilizado este criterio. Mediríamos el punto de congelación o la tensión del vapor en diferentes momentos, pero probablemente por ser método largo no se utiliza.

Variaciones en la conductibilidad eléctrica. Este método es cómodo, y se ha seguido en algunos casos por haberse demostrado que su variación sigue paso a paso las variaciones químicas, por ejemplo, en la digestión de la gelatina por la acción de la tripsina. El aumento de la conductibilidad parece ser que en este caso se debe exclusivamente casi a la formación de peptonas y amino-ácidos. Puede emplearse, como es natural, en otros casos de fermentaciones proteolíticas. En la fermentación de grasas en que aparecen ácidos libres, se puede uti-

(1) Para más detalles, véase en la Primera parte «Medida de la tensión superficial con la pipeta cuentagotas».

lizar también, pues éstos aumentan la conductibilidad. En cambio, como al fermentar los hidratos de carbono, en general, no se producen electrólitos, no habrá variaciones de este orden y, por lo tanto, no será utilizable este método. También se ha utilizado alguna vez el estudio de la *variación en el índice de refracción*, pero no es de interés práctico por ahora este procedimiento.

Variaciones osmóticas. Tienen interés desde que ABDERHALDEN las utilizó para descubrir los llamados «fermentos defensivos» de la sangre, diremos dos palabras aun cuando no sirvan para estudios de cinética de la fermentación.

Cuando en la sangre de un individuo se ha introducido por cualquier causa un albuminoide extraño, bien sea intencionadamente, inyección, por ejemplo, o por el funcionamiento patológico de un órgano, o por aparecer funciones especiales en ciertas épocas de la vida, como las de la placenta en las embarazadas. En todos estos casos, estos productos anormales, como decíamos, llegan a la sangre y ésta reacciona formando fermentos defensivos quizá específicos. Para descubrirlos, ABDERHALDEN saca sangre del individuo y obtiene el suero, vierte algo de éste en el saquito dializador y le añade unos trocitos del extracto del órgano cuya enfermedad se quiere diagnosticar. Si se tratase del diagnóstico prematuro del embarazo se añadiría extracto de placenta. Se coloca el saquito con su contenido en agua destilada (fig. 61), y se deja para que dialice durante unas dieciséis horas en el termostato

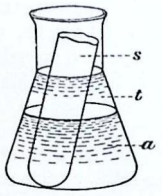


FIG. 61. Dializ ación para la reacción, de ABDERHALDEN

s, saquito dializador; *a*, agua destilada esterilizada; *t*, capa de toluol para preservar el agua

Después cogemos un poco del líquido exterior, y por medio de un reactivo sensible de las peptonas (la nihydrina) probamos si existen éstas o no. Es claro, si el suero tuviese el fermento, éste atacaría los albuminoides del órgano en extracto allí colocado, y las peptonas formadas pasarían por ser dializables al agua exterior a través del saquito, y la reacción sería positiva; en caso contrario, negativa. Si, por ejemplo, la reacción era positiva en el caso de haber colocado en el saquito extracto de tiroides, o de placenta, esto nos indicaría que el individuo había fabricado fermentos antitiroides o antiplacenta; y esto lo hizo porque tales órganos funcionan extrañamente, es decir, patológicamente o por el embarazo, respectivamente. Esta reacción requiere una limpieza y una técnica delicadísima, tanto para obtener el suero como para obtener los albuminoides específicos de los órganos, como para realizar la reacción con la nihydrina y requiere aparatos *ad hoc*, por eso no se ha extendido en la práctica médica (1). HIRSCH, de Jena, utiliza el *interferómetro* para delatar las peptonas en vez de la nihydrina. Cuando el autor estaba en Halle este procedimiento óptico estaba en estudio. Sea cualquiera el método que empleemos para seguir la reacción, necesitamos para poder comparar los resultados que el medio permanezca, en lo que de nosotros depende, en condiciones de temperatura y acidez sobre todo, rigurosamente constantes, por eso necesitamos decir dos palabras sobre ello.

(1) Para más detalles véase el libro *Die Abderhaldenschereaktion* (J. Springer, Berlín). Autor, EMIL ABDERHALDEN.

Conservación de una temperatura constante. Es tan grande la influencia de la temperatura, en la marcha de la reacción, que sería absurdo querer comparar resultados obtenidos a temperaturas diferentes, a menos que no sea precisamente la influencia de ésta la que queremos estudiar. Por eso los tubos, frascos, etc., donde se realizan las fermentaciones que estudiamos en su cinética, deben conservarse a temperaturas constantes. Esto se consigue colocándolos en estufas especiales (figura 62), o en otros termostatos (fig. 63), siguiendo las indicaciones que encontraremos en las obras especiales (1).

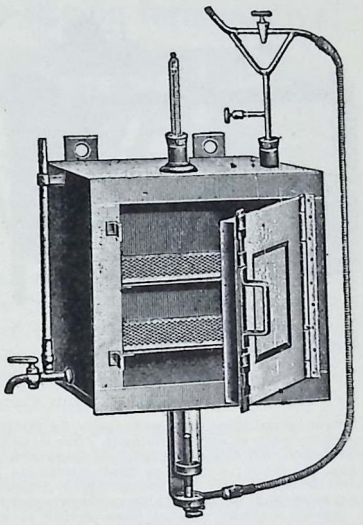


FIG. 62
Estufa de temperatura constante con mechero de gas y regulador

Conservación del grado de acidez o basicidad del comienzo. Esto se consigue añadiendo al líquido que fermenta *reguladores* «Puffer», de que ya hablamos brevemente en el capítulo VIII (2).

Suele utilizarse la mezcla de fosfatos, y cerciorarse por el método electrométrico de la conservación del número primitivo de hidrogeniones o de hidroxiliones OH. Este dato es tan importante como la temperatura, de tal modo que los datos antiguos obtenidos sin tenerlo en cuenta, por desconocimiento de su influencia, ha sido nenesario revisarlos. Afortunadamente, ya dijimos que en los líquidos orgánicos abundan estos reguladores, tales son los albuminoides, sales diversas, etc., por eso, sin saberlo, los antiguos trabajaban con constancia de la reacción sin añadir reguladores. Muchos de los datos obtenidos por ellos son por esta circunstancia válidos.

(1) Es muy recomendable el libro de OSTWALD-LUTHER, titulado *Physikochemische Messungen*, Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft, M. B. H.
(2) Véase (capítulo VIII sobre «Determinación de iones H»).

Después de haber indicado la importancia de la constancia de la temperatura y reacción del medio, comprenderemos el interés que tiene el

Modo de interrumpir la reacción para hacer las pruebas. — Cualquier procedimiento es peligroso. Si, por ejemplo, elevamos mucho la temperatura para parar la fermentación, conseguiremos nuestro objeto; pero en el espacio de tiempo habido entre ambas temperaturas, por rápido que hayamos hecho el cambio, habremos espoleado la actividad de la fermentación tan enormemente al principio, que los resultados serán inservibles en absoluto. Extremando las precauciones, o por enfriamiento rápido hasta la congelación, se puede en algunos casos conseguir resultados menos malos.

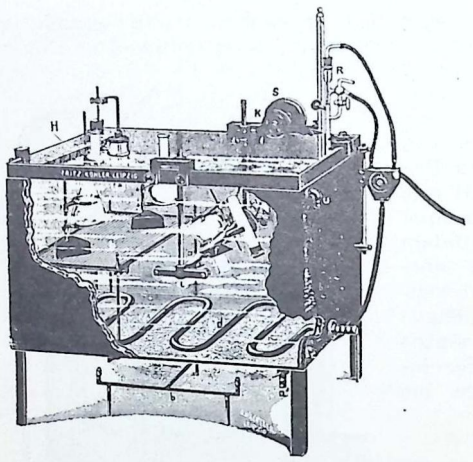


FIG. 63. Termostato, según OSTWALD

La caja es metálica con protección de fieltro; *U*, es el sumidero para el exceso de agua; por *a*, se puede vaciar totalmente. En el eje *a* giratorio, merced a la rueda *s* y polea sin fin *K*, se pueden fijar mediante soportes los tubos de ensayo, de ERLENMEYER, y demás recipientes cuyo contenido deba agitarse constantemente. También se pueden colocar paletas para agitar el agua manteniendo la misma temperatura en todo el recipiente. La rejilla *b* lleva los frascos que deben permanecer inmóviles. Se calienta con gas regulado por *R*. También lleva el tubo *d* por el que puede circular agua fría en el caso de que convenga sostener constantemente una temperatura inferior a la ambiente

Lo mismo se puede aplicar a la interrupción de la reacción por medios químicos, añadiendo, por ejemplo, amoníaco o un álcali a la pepsina, un ácido a la tripsina, etc.

Pero siempre serán preferibles los procedimientos que permiten seguir las variaciones de la fermentación sin detenerla. Tal sucede con los métodos basados en seguir paso a paso las variaciones de la viscosidad, de la conductibilidad eléctrica, etc., y sobre todo del poder rotatorio sobre la luz polarizada, que se aprecian en un momento sin alterar para nada el líquido.

CAPÍTULO II

Ideas actuales sobre la acción fermentativa, catálisis y fermentación

La hipótesis actual más importante sobre las fermentaciones. — Es tal la tendencia que se advierte hoy entre los investigadores, de afirmarse en la vieja idea de que los fermentos son simples catalizadores, que parece oportuno comenzar hablando de la catálisis en general, y exponer luego las semejanzas entre ella y la acción fermentativa. Como no han faltado objeciones a tal hipótesis será necesario en tercer lugar estudiarlas para ver lo que puede haber de cierto en ellas. Por último, el hecho de que los fermentos se presenten siempre en estado coloidal hace que debamos ocuparnos al acabar el capítulo de las ventajas que tal estado ofrece para que realicen esta labor catalizadora y de lo muy bien que se prestan las propiedades de los coloides para explicar numerosos fenómenos fermentativos.

Valor de esta hipótesis. Antes de entrar en materia será conveniente advertir, que aun cuando fuese cierta, no representa en modo alguno una solución total del problema. Tan desconocida en su esencia es la acción catalítica como la fermentativa. Sustituímos, pues, un enigma por otro. Pero la sustitución tiene la ventaja de llevar el problema a un terreno en el que nos podemos orientar mucho mejor, pues conocemos un dato importante. Trabajamos con *agente conocido* y será, por lo tanto, más fácil encontrar su explicación. Resumiendo: conocemos los efectos producidos, tanto por los catalizadores como por los fermentos. De los primeros sabemos también el agente, no así de los segundos. Y de ambos, por fin, tratamos de inquirir el modo o el cómo realizan su acción. Esta hipótesis ha permitido, además, explicar muchos hechos de las fermentaciones.

I. Catálisis y fermentos en general

Algo de historia sobre catálisis y fermentos. Ya desde principios del siglo XIX, conocieron KIRCHHOFF, DAVY, PHILLIPS, etc., casos de substancias que activaban ciertas reacciones sin intervenir en ellas. El primero conoció, desde 1811, la transformación de almidón en dex-

trina y azúcar en presencia de ácidos minerales, sin que variasen ellos mismos durante la reacción. Los dos últimos conocieron la influencia del platino finamente dividido sobre determinadas reacciones, como lo prueba el existir una patente de PHILLIPS, de 1831, sobre la obtención del ácido sulfúrico anhidro valiéndose de la acción de presencia de la esponja de platino.

MITSCHERLICH (1794-1863), minerálogo y profesor de Química en la Universidad de Berlín, que descubrió el isomorfismo, trabajó sobre la formación del éter sulfúrico, y a propósito de este trabajo y del estudio de otras reacciones en las que se repetía el hecho de que uno de los componentes aparecía invariable al final de la reacción, habló de acciones *por contacto*. Esta expresión fuí sustituída por la de *catálisis* introducida por el profesor sueco BERZELIUS (1779-1848), el cual indicó por primera vez la relación entre las acciones catalíticas y las fermentativas y habló de biocatalizadores.

Pasaremos por alto, por no alargar, la interesante disputa entre LIEBIG (1803-1873) y PASTEUR (1822-1895). El primero era avitalista y atribuía las fermentaciones a la acción del oxígeno del aire, negando la influencia preponderante de los microorganismos que defendía PASTEUR francamente vitalista, y entraremos en la exposición de

La situación del problema. El progreso enorme de la Química durante los últimos tiempos, que ha traído consigo el conocimiento más perfecto de muchas reaccione , ha hecho que consideremos hoy, desde el mismo punto de vista, la inversión del azúcar de caña en presencia de ácidos o de catalizadores metálicos, como platino, paladio, iridio, plata, que la influída por el fermento invertasa. Comparamos la descomposición del H_2O_2 en presencia de extractos de tejidos orgánicos que contienen catalasa, con la producida bajo la acción del manganeso, platino, plata, etc. La producción de alcohol y de CO_2 en una mezcla de aldehido acético y ácido fórmico en presencia del rodio, la relacionamos por parecer que tiene analogías con la fermentación de la glucosa por la levadura. La acetificación del alcohol por el micoderma es en todo comparable a la producida en presencia del platino en ciertas condiciones. La descomposición de la cistina por el carbón animal en CO_2, H_2O, SO_4H_2 y NH_3 es idéntica al proceso que ella sufre dentro del organismo, etc. En una palabra, catálisis metálica, acción enzymática, fermentación y putrefacción por organismos son una serie de procesos que estudiamos desde el mismo punto de vista químico.

De BERZELIUS a OSTWALD se desenvolvieron las leyes de la cinética de las reacciones, y por eso la mística expresión de BERZELIUS cuando dice que «los catalizadores despiertan afinidades dormidas» se concretan con OSTWALD en estudios sobre influencia de catalizadores y fermentos en la velocidad de la reacción. Desaparecen las fuerzas vitales, los biógenos, las lábiles moléculas de albúmina viviente, y tantos otros conceptos vagos que se consideraban necesarios para explicar casi todos los procesos químicos del organismo, y se pesan y se miden estas reacciones como las demás y se equiparan a los restantes procesos químicos realizados fuera de los seres vivientes. Por eso parece oportuno, como clave para interpretar las fermentaciones, comenzar por hablar de la *catálisis inorgánica* y ver luego las analogías existentes y las objeciones que se han hecho a tal asimilación de fenómenos.

Catálisis inorgánica. La idea que los químicos se han hecho de lo que es catálisis, ha ido, como es lógico, variando desde sus comienzos. Ya hemos dicho que BERZELIUS decía que «la fuerza catalítica parece que consiste propiamente en la facultad que ciertos cuerpos poseen de despertar sólo con su presencia, y no por su afinidad, energías durmientes a la temperatura en que actúan».

Pero es notable que BERZELIUS, a pesar del poco material de hechos entonces conocidos, llegase a tener un conocimiento tan profundo de la catálisis, demostrado por las cuestiones que se propuso y que son aún hoy de actualidad. Se preguntaba si la acción catalizadora sería específica, es decir, limitada la de tal catalizador a tal o cual compuesto, o por el contrario no específica, como lo es la acción del calor, luz, etc. Si los catalizadores no tendrían otro objeto que ordenar los elementos en los cuerpos compuestos, de modo que se alcanzase una neutralización electroquímica mayor. Tocaba, pues, dos cuestiones, especitidad catalítica y neutralización electroquímica al final de la reacción, sobre las que tanto se ha vuelto modernamente. Como dijimos, de él es también la idea de la semejanza de acción entre catalizadores y fermentos.

Actualmente, después de lo mucho que sobre catálisis se ha trabajado, y por investigadores de la talla de SABATIER, BREDIG, PAAL, etcétera, se puede decir que se ha llegado a conocer mejor la intervención de los catalizadores en los distintos momentos de la reacción, pero muy poco respecto a su esencia.

¿Qué son los catalizadores? Antes de definirlos comenzaremos por poner un ejemplo. Vamos a disolver azúcar de caña en agua, y estudiaremos sus caracteres en el polarímetro ; después calentemos la solución largo rato y volvamos a estudiar su acción sobre la luz polarizada, y se apreciará un cambio en esta propiedad, que será una prueba de que la inversión del azúcar está ya en marcha ; enormemente grande sería el tiempo necesario para poder apreciar este cambio, si el agua no la hubiésemos calentado, pero no obstante tiene lugar también la inversión. Si en cambio, añadimos a la solución unas gotas de un ácido, sea el clorhídrico, el sulfúrico, etc., y calentamos algo, la transformación es rapidísima, y al final de ella el análisis nos demostraría que el ácido aparece en la misma cantidad que al principio. En este caso, el ácido es el catalizador.

Vemos en este ejemplo : *Primero*. Que el ácido, *sólo* acelera la inversión que tiene ya lugar de por sí en el agua pura. *Segundo*. Que

el final del fenómeno es igual en todos los casos, esto es, la inversión total del azúcar, claro que en tiempos muy distintos. *Tercero.* Que el ácido no se ha gastado ni poco ni mucho durante la reacción. Ahora podemos pasar a la

Definición de catalizadores. Hoy se admite la que dió GUILLERMO OSTWALD y que es aplicable a todos los catalizadores ; dice así : « Los catalizadores son substancias que modifican la velocidad de las reacciones (acelerándola o retrasándola), reacciones que están ya en marcha y sin que aquellos modifique del equilibrio final .» Es decir, se admiten estos tres hechos : 1.°, los catalizadores no son capaces de provocar el comienzo de una reacción ; 2.°, sólo actúan sobre las ya comenzadas acelerándolas o retrasándolas ; 3.°, el equilibrio final de la reacción es siempre el mismo, siendo indiferente para este estado final que la reacción se haya realizado por sí sola o bajo la influencia de catalizadores ; 4.°, estos aparecen inalterados al final del fenómeno.

Los casos de catálisis en que la velocidad de la reacción es influída en el sentido de disminuirla se suelen llamar *catálisis negativas*, por ejemplo, vestigios de vapores de éter frenan la oxidación del fósforo en el aire.

Es claro que nos referimos a reacciones lentas cuando hablamos de catálisis. Las reacciones entre iones, por ejemplo (en la precipitación de los cloruros por el nitrato de plata, la unión del ión Cl con el Ag), se realizan instantáneamente, y de éstas aquí no tratamos.

¿Cómo obran los catalizadores? Un poco más adelante hablaremos de hipótesis sobre catálisis. Ahora nos limitaremos a aclarar el concepto por medio de comparaciones. BREDIG comparaba la acción de los catalizadores a las grasas de las máquinas, y BAYLISS hace el símil siguiente, que resulta mucho más gráfico, dice así: Supongamos un plano inclinado y en su parte superior un peso de metal, hagamos que la inclinación de aquél sea suficiente para que el peso resbale, pero lentamente, y dejamos todo así dispuesto y el peso arriba pero sostenido por un pequeño gancho o cuña. Soltemos el gancho y midamos el tiempo que el peso tarda en caer y el trabajo realizado. Repitamos luego la experiencia después de haber engrasado el plano inclinado y midamos, como antes, tiempo y trabajo. Es evidente : 1.°, que a pesar de la grasa (catalizador en símil) si no soltamos el gancho quedará arriba el peso sujeto por él (primera condición: el catalizador no es capaz de provocar la reacción); 2.°, veremos que suelto el gancho la velocidad de la caída es mucho mayor (segunda condición : la grasa, como los catalizadores, modifica la velocidad); 3.°, el peso llegaría en ambos casos al mismo sitio, es decir, al plano horizontal, y el trabajo realizado será, por lo tanto, el mismo, producto del peso del cuerpo que cae por la altura del punto inicial de la caída (tercera condición : la grasa como el catalizador no modifican el equilibrio final); 4.°, la grasa, a menos que se pegue al peso quedará invariable. Ya veremos que así como

aquí lo natural es que algo de la grasa desaparezca del plano inclinado por haberse adherido al peso, en catálisis sucede muchas veces, y mucho más en las fermentaciones, que el catalizador o el fermento pueden disminuir o alterarse por diferentes causas en el curso de la reacción conduciendo a falsos equilibrios finales que parece se oponen a las leyes de las reacciones, que luego expondremos.

Hemos hablado de equilibrio final de las reacciones y nos parece oportuno poner un ejemplo, para poder discutir y aquilatar mejor este concepto.

Equilibrio químico (1). Mezclemos nosotros alcohol etílico y ácido acético, y veremos que se forma éter acético y agua.

$$C_2H_5OH + CH_3COOH \rightleftarrows CH_3COOC_2H_5 + H_2O$$

Supongamos a los dos primeros más o menos diluídos en agua, entonces veríamos que la velocidad con que se combinan entre sí es tanto mayor cuanto mayor sea su concentración. Y esto es, además, evidente, pues dicha velocidad dependerá de las probabilidades de encuentro de las moléculas reaccionantes en la unidad de tiempo, y esta frecuencia de los choques entre moléculas que están en continuo movimiento, dependerá a su vez de la abundancia por la unidad de volumen, es decir, de su concentración. Podemos ya, por lo tanto, enunciar la siguiente *ley* : « La velocidad de una reacción en cada momento es proporcional a la concentración de los cuerpos reaccionantes en este momento. » Estas ideas fueron en parte expuestas por BERTHOLLETS en su obra *Essai de statique chymique*, 1803, pero su demostración experimental y su expresión como ley no llegaron a ser un hecho hasta mucho después. Su expresión matemática en el ejemplo citado será ésta

$$V_1 = K_1 \, (C_2H_5OH) \, (CH_3COOH)$$

V_1 es la velocidad de la reacción en un momento dado, los paréntesis indican las concentraciones de alcohol etílico y ácido acético en ese momento, y K_1 una constante. Por velocidad de la reacción entendemos la cantidad de moléculas que en cada sistema se transforman, durante la unidad de tiempo y en la unidad de volumen. De estas transformaciones nos pueden dar idea, como es lógico, análisis sucesivos. La tendencia del alcohol y del ácido acético a reaccionar será tanto mayor cuanto mayor sea la concentración, es decir, al principio, pues con el tiempo al desaparecer moléculas de ambos, disminuirá la velocidad de la reacción en este sentido. Pero es que a medida que la reacción avanza aumenta el número de moléculas formadas del éter y de agua, que también reaccionan entre sí, por ser ésta una

(1) Para profundizar en estas cuestiones puede recomendarse a biólogos y médicos el excelente libro *Physikalische Chemie der zelle und der Gewebe*, de RUDOLPH HÖBER. Leipzig. 6.ª edición, 1926.

reacción reversible, y podremos escribir también según la ley citada

$$V_2 = K_2\ (CH_3COOC_2H_5)\ (H_2O)$$

Como ambas trabajan en sentido opuesto, la velocidad total de la reacción vendrá dada en un momento dado por la diferencia entre las velocidades de los dos miembros antagónicos. Es decir, por

$$V_1 - V_2 = K_1\ (C_2H_5OH)\ (CH_3COOH) = K_2\ (CH_3COOC_2H_5)\ (H_2O)$$

Y con esto llegamos al concepto de

Equilibrio de la reacción. Que se establecerá evidentemente cuando se transformen el mismo número de moléculas en un sentido que en el otro, es decir, cuando $V_1 = V_2$, sería entonces $V_1 - V_2 = 0$, lo cual quiere decir que la reacción está, por decirlo así, estática o en equilibrio.

También podemos escribir si $V_1 = V_2$ que

$$K_1\ (C_2H_5OH)\ (CH_3COOH) = K_2\ (CH_3COOC_2H_5)\ (H_2O)$$

ó será :

$$\frac{K_1}{K_2} = K = \frac{(CH_3COOC_2H_5)\ (H_2O)}{(C_2H_5OH)\ (CH_3COOH)}$$

y si fuesen varias las moléculas que reaccionan en un sentido y las llamamos 1, 2, 3, etc., y llamamos C_1, C_2, C_3 a sus concentraciones en un momento dado, y *a*, *b*, *c*, etc., las moléculas en que aquéllas se transforman, y C_a, C_b, C_c, etc., sus concentraciones. Y K la constante llamada de equilibrio, o sea, como hemos visto arriba, la relación entre K_1 y K_2 tendremos

$$K = \frac{C_a \cdot C_b \cdot C_c \ldots\ldots}{C_1 \cdot C_2 \cdot C_3 \ldots\ldots}$$

fórmula llamada de GULDBER y WAAGE, en honor a los químicos noruegos que la enunciaron. O como NERNST la llamó igualdad de la « isoterma de la reacción » por tener su validez siempre que la temperatura permanezca invariable.

Todo lo que acabamos de decir para las reacciones llamadas reversibles, es valedero también para las irreversibles, puesto que al fin y al cabo éstas no son sino reacciones reversibles en que las concentraciones del primer miembro $C_1 \cdot C_2 \cdot C_3$, etc., se hacen al fin enormemente pequeñas, sobre todo si las comparamos con las del segundo miembro $C_a \cdot C_b \cdot C_c$, etc., y parece que todo el primer miembro ha desaparecido para formar el segundo. Claro es que hay toda clase de tránsitos entre los dos extremos, y aun para las reacciones aparentemente más irreversibles, como la precipitación de iones Ag por Cl quedan en la solución vestigios de los primeros demostrables por el análisis. En principio, pues, no hay reacciones irreversibles, y es

de interés repetir esto, pues las descomposiciones hidrolíticas de substancias orgánicas por fermentos podrían parecerlo, y sin embargo, ya veremos que obedecen en absoluto a la ley anterior.

Es preciso advertir que una variación de la temperatura modifica la ecuación de equilibrio, favoreciendo uno u otro miembro de la doble reacción, según que se trata de disminución o aumento de temperatura y de reacciones exotermas o endotermas, como puede comprenderse. Esta relación termo-química tiene gran importancia para el estudio cinético de las reacciones en general, y de las fermentativas en particular, que sólo podrán compararse entre sí, si se realizan a la misma temperatura.

Deducciones teóricas de todos estos hechos aplicados a la catálisis y a fermentaciones. Supongamos que la reacción anterior se ha verificado en presencia de un catalizador y que ha llegado ya al equilibrio que la ley establece para una temperatura dada sin catalizador, como quiera que éste aparece totalmente al final de la reacción, no habiendo variado no habrá podido producir energía alguna, y, por lo tanto, *no habrá podido influir en el equilibrio de la reacción*. Para ver esto más claro, llamemos C_1 y C_2 a las concentraciones respectivas de ácido y alcohol (primer miembro de la reacción) y C_3 y C_4 a las de éter y agua ; V_1 y V_2 a las velocidades y K_1 y K_2 a las constantes respectivas de la primera y segunda de las reacciones. Dejemos que el sistema llegue por sí sólo, sin catalizador al estado de equilibrio, lo cual querrá decir que $V_1 = V_2$ ó

$$K_1C_1C_2 = K_2C_3C_4 \quad \text{ó sea} \quad \frac{K_1}{K_2} = K = \frac{C_3C_4}{C_1C_2}.$$

En este momento, sin variar la temperatura, añadamos un catalizador, y supongamos por un momento que éste ha provocado un nuevo equilibrio, con la variación consiguiente de las concentraciones en los dos miembros del sistema, la nueva fórmula sería por ejemplo : $K' = \frac{C_3'C_4'}{C_1'C_2'}$. En este momento retiremos el catalizador y necesariamente, no habiendo cambiado la temperatura, el sistema se moverá para conseguir el equilibrio que es por ley el único estable a la temperatura dada, es decir, otra vez a $K = \frac{C_3C_4}{C_1C_2}$. Como a cada cambio de equilibrio corresponde un desprendimiento de calor, podríamos estar creando éste (= energía) continuamente sin más que echar y quitar el catalizador, sin que por ningún lado viésemos pérdida de otra energía (la temperatura la conservamos constante), ni pérdida de substancia, pues tanto el catalizador como el estado de equilibrio primitivo aparecen siempre, cada vez que retiramos aquél. Sabemos que esta creación de la energía de la nada es un absurdo. Por esto una vez conocida la ley de equilibrio de las reacciones, y averiguado el hecho de la invariabilidad del catalizador, se hubiese podido de-

ducir *a priori* y con carácter necesario la regla de que los *catalizadores no pueden variar el equilibrio final de las reacciones*. Solamente podrán aumentar la velocidad del proceso para llegar a él. Como la grasa del ejemplo de Bayliss no puede aumentar el trabajo total del peso que cae, aunque pueda hacer que éste se desarrolle en menos tiempo, haciendo que el peso resbale más de prisa.

Vamos a tratar de otra consecuencia interesantísima para el caso nuestro de las fermentaciones, confirmada también por la experiencia y que vino a echar por tierra la creencia antigua de que los fermentos sólo realizaban descomposiciones. Veremos que necesariamente *todos los fermentos realizan síntesis*. Partamos del hecho de que en nuestro ejemplo del alcohol y del ácido acético, en el momento del equilibrio se cumple la ley de que a la misma temperatura

$$\frac{K_1}{K_2} = K = \frac{C_3C_4}{C_1C_2}$$

o sea que las concentraciones son constantes a una temperatura dada. Preguntémonos ahora: en el caso de que el sistema esté en marcha, pero no en equilibrio, y añadimos un catalizador ¿cómo puede éste espolear la marcha del fenómeno hacia el equilibrio? Se nos ocurre, pues, haciendo que V_1 aumente, es decir, haciendo que el alcohol y el ácido acético reaccionen más vivamente (el medio para conseguir esto no nos interesa por ahora). Si no aumentase con la misma intensidad V_2, es decir, la reacción del éster con el agua, sucedería que siendo $V_1 = K_1C_1C_2$, como todo aumento de la velocidad de la reacción V_1, se traduce por desaparición de moléculas de alcohol y ácido acético, es decir, por disminución de su concentración C_1 y C_2 para que se conserve la igualdad última, K_1 aumentará; y siendo $\frac{K_1}{K_2} = \frac{C_3C_4}{C_1C_2}$, como K_1 ha aumentado más que K_2 ya que el segundo miembro lo suponemos no espoleado por el catalizador, es decir, conservando constante V_2, tendrá que ser $C_3C_4 > C_1C_2$ en cada momento en mucha mayor proporción que la que existe sin utilizar el catalizador. Es decir, que al llegar la concentración característica C_1C_2 del equilibrio del primer miembro del sistema, la concentración $C_3'C_4'$ de los del segundo, por reaccionar más despacio y desaparecer, por lo tanto, más lentamente, sería mucho mayor que la que corresponde a la marcada por la ley $K = \frac{C_3C_4}{C_1C_2}$, sería por ejemplo, $K' = \frac{C_3'C_4'}{C_1C_2}$. Y esta variación del equilibrio final a una temperatura dada sabemos que no es admisible.

Es decir, que si el catalizador aumentase la velocidad del primer miembro y no la del segundo, es evidente que aquél alcanzaría la concentración característica del estado de equilibrio mucho antes que el segundo, modificándose con ello la fórmula que sabemos no puede variar, según la ley que hemos llamado de la isoterma de la reacción.

Forzosamente tiene que aumentar el catalizador, la velocidad V_2 del segundo miembro.

Si tomásemos, por ejemplo, una reacción de las llamadas hidrolíticas, es decir, desdoblamiento de un compuesto por el agua

$$C_2H_5—OOC—CH_2—CH_2—CH_3 + H_2O \rightleftarrows C_2H_5OH + HOOC—CH_2—CH_2—CH_3$$

Ester etil-butírico + agua — Alcohol-etílico + ácido butanoico

el catalizador lo mismo que favorece la reacción del primer miembro (hidrólisis), tendrá que favorecer la segunda (síntesis).

Lo mismo sucedería si considerásemos el caso conocido de desdoblamiento de la sacarosa o cualquier otra hidrólisis de grasas, albuminoides, etc.

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Sacarosa + agua = glucosa + levulosa

Como la acción de los fermentos es una acción puramente catalizadora, según deduciremos de las consideraciones que siguen en este capítulo aceptándolo por ahora, podemos enunciar el siguiente importante principio: *Todo fermento hidrolítico es capaz de realizar la síntesis correspondiente.* Según las condiciones se producirá el desdoblamiento, por ejemplo, de la sacarosa en glucosa y levulosa, si hacemos actuar el fermento en una disolución de aquélla, o producirá sacarosa uniendo la glucosa con la levulosa, si la solución inicial fuese una mezcla de estos dos monosacáridos. Ni que decir tiene que en ambos casos se requerirán condiciones adecuadas para el buen éxito de la experiencia.

Esta consideración tan importante y tan en contra de la opinión antigua que juzgaba a todos los fermentos como agentes de descomposición solamente, condujo a experimentar si prácticamente se podía llegar a la síntesis de hidratos de carbono, de grasas y albuminoides por fermentos. Para los dos primeros tal comprobación se ha llevado a cabo repetidas veces con éxito, como luego veremos. La síntesis de albuminoides por fermentos, no ha podido realizarse todavía en la práctica; así Abderhalden y Rona fracasaron al intentar formar cadenas de polipéptidos uniendo por fermentos varios amino-ácidos.

Vamos a exponer dos experiencias realizadas para comprobar esta ley, la una utilizando un catalizador inorgánico, la otra un fermento.

Primera experiencia. El yodo y el hidrógeno reaccionan de 300° a 400° y forman IH, pero la reacción no es total, pues quedan siempre cantidades apreciables de I y de H por una parte y de IH por otra, que existen a una temperatura dada. Partamos del IH que se disocia en I + H en presencia del musgo de platino como catalizador, el equilibrio se alcanza en este caso en seguida, mucho más rápidamente que en el primer caso. Pero en ambos se establece, cuando existe un 19 % de IH sin descomponer a 350°. Esta proporción es, pues, constante a 350° independientemente del catalizador.

Segunda experiencia. La figura 64, tomada del libro citado de R. Höber, según una experiencia de Bayliss, demuestra lo admirablemente que se adapta al caso de un proceso ideal de análisis y síntesis por catalizadores, el de análisis y síntesis realizados por fermentos. Bayliss hizo dos mezclas ; la primera formada por glicerina, glucosa y agua, y la segunda por el glucósido, producto de la síntesis de los dos primeros (glicerina y glucosa) y agua. Todo en cantidades perfectamente equivalentes y añadió a ambas mezclas el fermento emulsina. El curso de la reacción fué estudiado siguiendo las variaciones ópticas que indica el polarímetro. Y el resultado fué que tanto en el primer caso en que la emulsina tenía que sintetizar, como en el segundo caso en que la emulsina tenía que hidrolizar, el equilibrio final era el mismo,

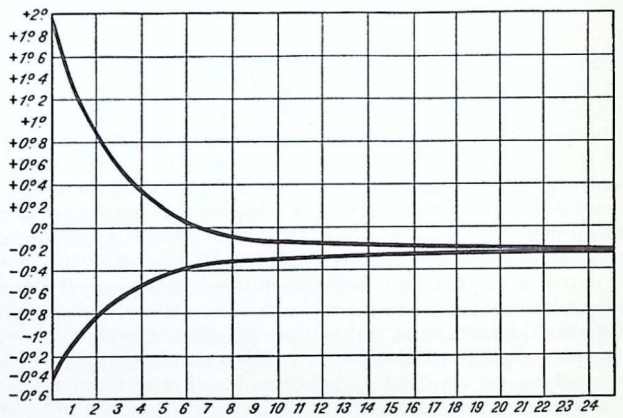


Fig. 64

y se estableció cuando se alcanzó en ambos casos el poder rotatorio $= -0{,}22°$.

Falsos equilibrios aparentes. Sucede a veces que tal ley fracasa aparentemente; veamos algunos casos para conocer la causa de tales pretendidas excepciones. El H_2O_2 es descompuesta en $H_2O + O$ en presencia de diferentes metales como Pt, Pd, Au, Fe, Cu, etc., y esta descomposición en todos estos casos es prácticamente completa. Si tomamos la plata como catalizador, la reacción, aunque también muy acelerada se detiene mucho antes de que se haya alcanzado la total disociación del H_2O_2. Aparentemente, hemos llegado a dos estados de equilibrio muy distintos, pero estudiando de cerca el caso, veríamos que la causa es que la plata se disuelve en el H_2O_2, con esto pierde su poder catalizador y al desaparecer como tal, la velocidad de la descomposición disminuye de tal modo, que prácticamente decimos

que es O, es decir, que se detiene. Pero en realidad la reacción continúa lentísimamente sin catalizador, y sería sólo cuestión de tiempo la consecución del estado de equilibrio verdadero a la temperatura dada.

La amigdalina es disociada por el platino finamente dividido, lo mismo que por la emulsina, pero en el curso de la reacción se forma HCN que *envenena* el platino, y hace que pierda su acción catalizadora reduciéndose la velocidad de tal modo, que nos parece nula, estableciéndose en este momento un estado de equilibrio aparente que es, como en el caso anterior, completamente falso. Sucede con los fermentos que son tan delicados que cualquier variación en el medio provocada por la misma reacción puede anularlos originándose un falso equilibrio. Por eso es tan distinta la acción de los fermentos *in vitro* que en vivo. La misma amigdalina que acabamos de citar, se descompone totalmente por la acción de los ácidos o por la del agua a elevada temperatura, al paso que la descomposición es sólo parcial en presencia del fermento, emulsina. Probablemente, esto es debido a que ésta es anulada por algunos de los productos formados, como lo prueba el hecho de que sin más que añadir nueva emulsina, adelanta de nuevo la reacción. En el intestino del hombre donde continuamente son alejados los productos resultantes de las fermentaciones, como peptonas, glucosas, etc., que pasan a la sangre, llega la acción de los fermentos mucho más lejos que en los tubos de ensayo. En vano queremos para imitar al organismo, reproducir *in vitro* las buenísimas condiciones en que en aquél se desarrollan las fermentaciones ; sólo conseguimos mantener la temperatura constante con los termostatos, la acidez o basicidad invariable por medio de los reguladores « Puffer ». Pero nos sería necesario, además, limpiar continuamente el medio de los productos resultantes, retirándolos en seguida de formados, como lo hace el organismo, y tal purificación nos es imposible por ahora.

Esta anulación de los catalizadores y fermentos por los productos que aparecen con motivo de las reacciones, nos hace pensar que es muy probable que sea debido a

Uniones entre los catalizadores o los fermentos con los productos resultantes de las reacciones. — En apoyo de tan importante creencia podemos aducir, además de los hechos citados, muchos otros, pero nos concretaremos al caso muy instructivo de Abderhalden y Gijón, que es el siguiente : Pusieron a fermentar el dipéptido glicil-l-tirosina, por la acción del jugo de levadura (preparado, como dijimos, en el capítulo anterior). Estudiada su marcha, repitieron la experiencia añadiendo una vez glicocola (o sea glicina), y otra vez l-tirosina ; es decir, querían probar el efecto que sobre la fermentación ejercían los dos productos resultantes de ella. El resultado fué que la glicocola no alteró en nada su velocidad al paso que la l-tirosina la retardó enormemente. Parece, como más seguro, que la l-tirosina se unió con el

fermento anulándolo en parte o totalmente, «lo ha desviado», como se dice en la inmunorreacciones de WASSERMANN, etc.

Es curioso que probaron la acción de otros amino-ácidos, comprobando la desviación del fermento por la d-alanina y l-leucina, que con tal signo óptico entran en las combinaciones orgánicas, y en cambio, no hubo afinidad entre el fermento y la l-alanina y la d-leucina que no existen con tal signo en las moléculas de los albuminoides fabricados por el organismo. Sabiendo que la diferencia estructural entre los dos antípodas ópticos (formas dextrógira y levógira) debe ser mínima, y que sin embargo, es suficiente para que, para una de las formas muestre afinidad el fermento y para la otra no, se comprende que se admita una cualidad de los fermentos sobre la que más tarde insistiremos, a saber: **Que la acción de muchos fermentos es marcadamente específica.** A propósito de esta experiencia dicen sus autores, que la hidrólisis de los albuminoides en el intestino va tan lejos, precisamente porque los productos formados que pueden frenar y hasta paralizar la reacción por desviar el fermento parcial o totalmente, son inmediatamente alejados por la absorción intestinal.

Otras causas de aparentes falsos equilibrios. No hace falta que el catalizador o el fermento desaparezcan por desviación, para que su acción se paralice; basta que durante la reacción se produzca un ácido o una base que no sean tolerados por aquél, para que la acción del fermento o del catalizador cesen. Así, podemos oxidar el aldehido salicílico que pasa a ácido salicílico por la acción del fermento oxidativo del hígado, pero tal acción se para muy pronto, bastando añadir CO_3Na_2 que neutraliza el ácido formado para que se reanude el proceso. En este caso el fermento no tolera el cambio en la acidez del medio provocado por la formación del ácido salicílico.

En cambio, vemos que en las plantas se sintetizan continuamente grasas, almidón, albuminoides, etc., debido a que por su insolubilidad, en seguida de formados se condensan y aunque quedan allí, desaparecen químicamente pudiéramos decir, pues ya precipitados no reaccionan y la síntesis continúa, originándose un falso equilibrio aparente, de diferente especie que los antes citados. Ahora es el primer miembro del sistema el que va demasiado lejos, no se detiene nunca, en los casos anteriores era el primer miembro el que se detenía demasiado pronto.

Autocatálisis negativa. El caso citado en que un ácido formado frena la acción del catalizador o fermento que lo origina, recibe este nombre. Por el contrario, al estudiar la acción de la invertasa, se observó que a medida que avanzaba la reacción, aumentaba su velocidad. Este hecho extraño encontró su explicación cuando KULLGREN demostró que también la hidrólisis de la sacarosa por el agua a 100° aumentaba en velocidad con el tiempo, pero que era debido a que como producto accesorio se formaba un ácido que favorecía la inversión. Luego fué demostrada esta influencia favorable del ácido

citado, en el desdoblamiento de la sacarosa realizado por la invertasa. Se trata, como se ve, de un caso de *autocatálisis positiva*. Ambos nombres provienen de GUILLERMO OSTWALD, que en el terreno de la química corriente, había observado casos parecidos así. Si se hidroliza un éster por agua, la reacción va muy lenta al principio, pero en cuanto el ácido formado adquiere cierta concentración, la velocidad aumenta extraordinariamente. Este caso sería un ejemplo de autocatálisis positiva, como se podrían citar otros de negativa.

Vamos viendo la importancia que para la solución del problema de la fermentación ha tenido su comparación en la catálisis. El conocerse en el último caso el agente, nos ha permitido establecer con seguridad algunas condiciones a que se ajustan las acciones catalizadas y fermentativas, que resumiendo se reducen a estas tres. 1.ª *La imposibilidad de la variación del equilibrio de la reacción* deducida del hecho de aparecer el catalizador íntegro al final del fenómeno. 2.ª *La necesidad de que los catalizadores y fermentos sean a la vez analíticos y sintéticos*, que por las consideraciones antes expuestas se deduce de la anterior. 3.ª *La pequeñísima cantidad en que obran los catalizadores y, por lo tanto, los fermentos*. Sólo conociendo el agente catalítico podemos darnos cuenta de las pequeñas cantidades que de él hacen falta para ejercer acciones considerables. BREDIG y V. BERNECK demostraron que el platino coloidal puede obrar como catalizador en la descomposición del H_2O_2, ejerciendo su acción sobre cantidades que son un millón de veces superiores a él. Trabajando con fermentos se suponía esto, pero sólo el poder aislar, pesar y conocer física y químicamente el agente, como sucede en el caso de la catálisis ordinaria, ha podido aportar la comprobación experimental de tales hechos.

Además, nos permite atacar el *nudo* de la cuestión, es decir, de la esencia de la acción fermentativa, desde el momento que intentamos resolver la siguiente cuestión.

¿Por qué o cómo ejercen los catalizadores su acción? Hemos dicho que el tiempo del verdadero catalizador no se transforma, no da, pues, energía alguna y que, sin embargo, acelera las reacciones, a manera que los lubrificantes en mecánica. Pero ¿cómo se concibe tal símil tratándose de reacciones químicas? Lo más probable es que los catalizadores obren no solamente por su presencia pasiva, sino entrando de algún modo en relación con uno o con los dos productos que reaccionan. Esta relación es posible que sea de orden puramente físico, o químico, o bien mixto. Pero el intento de considerar la acción de todos los catalizadores y para todas las reacciones desde el mismo punto de vista ha fracasado. Probablemente, los catalizadores no obran en todas las reacciones del mismo modo. Vamos a exponer algunos casos típicos en los que se pueda demostrar que existe realmente una.

Unión química provisional del catalizador con el substracto constituyendo los casos llamados de *catálisis por transmisión*. En química orgánica cuando se quiere clorar, es decir introducir Cl en un com-

puesto orgánico disuelto, se suele añadir una pequeña cantidad de yodo. Se forma el producto intermediario ICl_3 el cual cede el Cl al compuesto orgánico, él queda reducido a I y dispuesto otra vez a formar ICl_3 y así sucesivamente. Basta, pues, añadir sin interrupción cloro en gas hasta que termine la reacción que deseamos.

Otro ejemplo es la formación del éter etilítico como producto de la reacción del alcohol etílico con el ácido sulfúrico en las dos fases siguientes :

(1.ª) $C_2H_5OH + H_2SO_4 = C_2H_5HSO_4 + HOH$

(2.ª) $C_2H_5HSO_4 + C_2H_5OH = C_2H_5OC_2H_5 + H_2SO_4$

El ácido sulfúrico actúa, como se ve, de catalizador. El caso clásico, conocido desde antiguo, de la fabricación del ácido sulfúrico, en que se aprovecha uno de los óxidos de nitrógeno para oxidar en las cámaras de plomo el SO_2 en presencia del oxígeno del aire, es otro caso de catálisis por transmisión, o de catálisis con formación de productos intermediarios como también se la llama. En todos estos casos, aun cuando se haya podido demostrar la formación de los citados productos intermediarios, como tales y no simplemente como productos accesorios de la reacción, no se resuelve el problema, pues, como dice W. Ostwald, « por la formación de tales productos no se puede explicar, sin más, la aceleración de la reacción, a menos que no se demuestre que las reacciones intermediarias, se verifican efectivamente con más rapidez que la reacción directa ». Esto se ha podido demostrar patentemente en algunos casos, y en otros, sin esta comprobación, es muy verosímil que la mayor velocidad de tales reacciones intermediarias sea la única causa de la aceleración total y, por lo tanto, de la catálisis.

Catálisis en sistemas homogéneos. Las catálisis citadas, de la producción del éter, o de la descomposición del azúcar de caña por la acción de iones de H pueden servir de ejemplos de catálisis en sistemas homogéneos. Vemos que catalizadores y compuestos reaccionantes son todos líquidos. Debemos advertir que la acción catalítica se puede explicar en muchas ocasiones solamente por ser el catalizador un medio de reacción favorable. En este sentido, el agua es un gran catalizador, ya que sabemos que basta en muchas ocasiones disolver dos cuerpos en ella para que reaccionen enérgicamente. Pero no sólo el agua, sino todos los disolventes, participan a la reacción una determinada velocidad de tal modo que un disolvente puede ser un catalizador con respecto a otro. Bredig ha hecho el siguiente curioso experimento : disolvía acetato de metilo en benzeno a 25° y añadía trimetilamina y veía que ambos compuestos no reaccionaban, luego hacía una mezcla de aquel disolvente con 2,5 de agua y la agitaba hasta obtener una emulsión y añadía aquellos dos compuestos que reaccionaban entonces siendo el éster saponificado por la base. Aquí el agua no participa notoriamente en la reacción como en los casos

citados de catálisis por transmisión, y únicamente reúne en sus gotitas ambos componentes, disocia la base más fuertemente que el benzol y hace que en su seno la reacción se verifique mucho más rápidamente que cuando sólo había benzol. Vemos aquí otro procedimiento de acelerar una reacción sin añadir energía y bien distinto del anterior.

Catálisis en sistemas heterogéneos. Sucede a veces que dos compuestos reaccionan lentamente, estando ambos en el mismo estado, gaseoso, líquido, etc., y basta poner en su presencia una substancia en otra base o estado, por ejemplo, sólido para que éste obrando como catalizador active enormemente la reacción. Estas son las catálisis que se llaman en sistemas heterogéneos. El carbón vegetal activa como catalizador en ciertas reacciones entre gases. Puede adsorber grandes cantidades de ellos con desprendimiento de calor, y quizá esta circunstancia contribuya a acelerar reacciones entre gases, que sin él se verificaría lentamente. Sabatier que es uno de los primeros en defender la opinión de que la esencia de la acción de los catalizadores está precisamente en una unión accidental e intermediaria, con alguna de las substancias reaccionantes, acepta aquí una especie de unión entre el gas y el carbón vegetal. Quizá se pueda considerar la adsorción de gases por el carbón como una especie de disolución. Añadamos que la condensación de gases en una superficie equivale a una compresión de los mismos a una presión relativamente considerable con lo cual, como sabemos, facilitamos extraordinariamente las reacciones. Así el hidrógeno adsorbido por el paladio y el platino es más activo que el gaseoso, y por eso para obtener anilina, haciendo que reaccione el nitrobenzol con el hidrógeno, se hace pasar aquél sobre musgo de platino cargado por adsorción con hidrógeno.

$$C_6H_5NO_2 + 3\,H_2 = C_6H_5NH_2 + 2\,H_2O$$

Vemos con esto, otro procedimiento de aceleración de reacciones, de una importancia trascendental para el caso de las fermentaciones, por eso nos vamos a detener más en este género de catálisis que se llama

Catálisis por adsorción. La condición previa para que ésta se verifique es que haya efectivamente una adsorción (1), es decir, una unión íntima entre el catalizador y el substracto, por eso vamos a ver en qué hechos se funda esta idea de la *unión entre catalizador o fermento con el substracto*. En muchos casos se puede deducir la existencia de uniones íntimas entre ambos por el hecho de que diferentes catalizadores pueden influir sobre la descomposición de una misma substancia de muy diferentes maneras. Así, por ejemplo, el isobutilalcohol a 300° y en presencia del Cu, da aldehido e hidrógeno ; en presencia de arcilla, isobutileno y agua ; si el catalizador fuese bióxido

(1) Véase « Diferencia entre adsorción y absorción » en el capítulo I, nota, y en la Primera parte de este libro.

de uranio se forma aldehido y olefina. Siendo curioso que ciertos catalizadores presentan un óptimo de reacción a una determinada concentración de hidrógeno. Pero nos interesan más las *pruebas de la unión entre fermentos y substracto.* Lo mismo que para los catalizadores, se supone que debe haber una unión temporal entre el fermento y el substracto. La mejor prueba la encontraremos luego al hablar de la enorme especificidad de la acción fermentativa que no puede explicarse racionalmente sin admitir tal unión. Pero hablaremos ahora de lo claramente que se explican las relaciones entre la velocidad de la reacción y las proporciones relativas entre las cantidades de fermento y substracto, admitiendo una unión entre ambos. Supongamos que el fermento está en cantidad muy pequeña en relación con el substracto, entonces admitiendo tal unión deberemos suponer que todas las micelas del fermento pueden unirse con el substracto, y aun sobrará de éste, puesto que está en exceso. En este momento la velocidad de la reacción se comprende que esté en razón directa de la cantidad del fermento, puesto que todo éste trabaja, por decirlo así. Pero pasado el tiempo, como el substracto se transforma y el fermento no, llegará a sobrar éste y parte de él quedará inactivo, y, por lo tanto, desaparecerá tal proporción entre la velocidad de la reacción y la cantidad de fermento. Estas consideraciones explican que diferentes investigadores hayan llegado a enunciar leyes diferentes, cuando han buscado la relación entre la acción enzimática y la concentración del fermento. Para los catalizadores se ha encontrado frecuentemente una proporcionalidad directa entre la velocidad de la reacción y la cantidad de aquél. Esto depende casi con seguridad de que como es sabido que los catalizadores obran en cantidades pequeñísimas, y además, por ser conocidos se pueden valorar, sea pesándolos, analizándolos, etcétera, se habrán tomado instintivamente cantidades muy pequeñas para realizar tales experimentos. Por eso la ley enunciada tiene perfecta aplicación, pero, como se comprende, dentro de ciertos límites. Estamos en el caso del comienzo de nuestra experiencia con fermentos, es decir, cuando están en relación con el substracto en pequeñísima cantidad. Para los fermentos se ha admitido, en cambio, por muchos la llamada *ley de Schulz*, que dice que *la acción enzimática es proporcional a la raíz cuadrada de su concentración*. Para ver si se comprobaba esta ley en la práctica, realizó Bayliss unas experiencias muy instructivas referentes a la acción de la tripsina sobre la caseína, y nos vamos a permitir copiar el cuadro que las reúne y las consideraciones que de él se deducen. Como se ve en la figura 65 todas las casillas del cuadro llevan su indicación, únicamente necesita aclararse que los tiempos son los que necesitaron las mezclas, para pasar de una conductibilidad de 1.300 a 1.800 megohmio. Bayliss añade : « Si observamos los números de la segunda columna, vemos que la proporción lineal directa ha desaparecido; así, a una concentración mitad no corresponde un tiempo doble, sino menor que el doble ; si se cuenta la velocidad media (tercera columna) durante un mismo período se ve que a las concentraciones menores corresponde una actividad relativa, mayor que a las superiores. Esto se manifiesta mejor si dividimos la velocidad media por la cantidad de enzima (actividad por unidad o actividad específica) que es lo indicado en la cuarta columna. En la última se hallan los números teóricos de la actividad específica de cumplirse la ley de Schütz-Boristow. Como se ve, para esta experiencia concuerdan bastante bien los resultados experimentales con los deducidos según la ley de Schütz. Pero fijémonos bien que esta ley sólo se cumple dentro de ciertos límites, lo mismo que la de la proporcionalidad directa dentro de otros, así que sólo la experiencia nos podrá decir si en un caso dado será aplicable la una o la otra o ninguna de las dos.

Cantidad relativa de tripsina (c)	Tiempo necesario (t)	Velocidad media $= \frac{1}{t} \times 1000 = v$	Actividad específica $= \frac{v}{c}$	
			encontrado	Calculado según la regla de la raíz cuadrada
4	41	24	6	6
2,5	48	20,8	8,3	7,6
2	55	18,2	9,1	9,3
1	88	12,4	12,4	12,7
0,5	144	7	14	17,5

Fig. 65

Resumiendo : Conforme deducimos teóricamente al principio, partiendo de la base de la unión de enzima y substracto, la experiencia ha demostrado que la ley de la actividad enzimática en relación con su concentración, varía según las concentraciones relativas de enzima y substracto y, por consiguiente, según los diferentes momentos de la reacción. Pudiendo añadir que oscila frecuentemente y para los casos ordinarios entre la proporcionalidad directa y la proporcionalidad con la raíz cuadrada de la concentración. Siempre dentro de límites no excesivos, como hemos dicho.

Otros hechos explicables admitiendo la unión temporal por adsorción del substracto por el fermento. Hemos hablado de los falsos equilibrios explicados por la desviación del fermento por otros productos. Pues bien esta desviación como mejor puede explicarse es admitiendo que el fermento y el desviante se unen por adsorción, como lo prueba el hecho de que *los mayores venenos* para los fermentos (los que anulan su acción desviándolos probablemente) son precisamente las substancias llamadas activas contra la tensión superficial, que, según se sabe por la química coloidal, *son las más adsorbibles* por el carbón (1), etc. Así, la oxidación del ácido oxálico utilizando el

(1) Véase capítulo « Tensión superficial » en la Primera parte.

carbón animal como catalizador, es frenada y hasta paralizada por el uretano que es altamente adsorbible por aquél. También influyen en este sentido otros modificadores de la tensión superficial, o sea adsorbibles. MEYERHOF ha demostrado un proceder análogo tratándose de la invertasa, siendo parecidas las consideraciones que se hacen al hablar de la teoría de la narcosis. Del mismo modo la ureasa de los granos de soya, que transforma la urea en carbonato amónico, puede ser envenenada por la saponina, que es muy activa como modificadora de la tensión superficial. Habiendo demostrado BAYLISS que esta acción frenadora y la adsorbible de la saponina van paralelas. Todos estos hechos parecen indicar que si los desviadores son, como parece demostrado, substancias adsorbibles, obrarán impidiendo que la adsorción tenga lugar entre el fermento y el substracto, condición previa para la fermentación.

AGAZOTTI observó al ultramicroscopio que al final de una reacción enzimática quedaban sin atacar cierta cantidad de granitos, mayores que los granitos enzimáticos o del substracto. El cree que son complejos por adsorción entre enzima y productos de la reacción. Pero la prueba que parece definitiva es la siguiente : Se ha visto al estudiar la adsorción, que si añadimos a una solución un adsorvente del cuerpo disuelto, se establece al fin un equlibrio entre la atracción de éste por el adsorbente de una parte, y la tendencia natural de las partículas o moléculas disueltas a esparcirse en el disolvente (difusión) de otra. Pues bien ; existe una fórmula empírica que relaciona la cantidad de soluto adsorbida x con la cantidad del adsorbente m y con la concentración c, de lo que el cuerpo disuelto queda todavía en solución. Esta fórmula es : $\frac{x}{m} = K\, c^n$ en la que K y n son dos constantes que hay que averiguar en cada caso dependientes de la naturaleza del carbón o del adsorbente usado y de la del cuerpo disuelto. Esta fórmula se llama *isoterma de la adsorción de Freundlich* (1) porque, como en la isoterma de la reacción de que hablamos antes, es constante para una *misma temperatura* sean cuallesquiera los valores x ó de m, ó de c.

De esta fórmula no hubiésemos hablado ahora, si no fuese porque nos permite conocer la concentración de la substancia x en la superficie del adsorbente m, cuya concentración por unidad de superficie será como es natural $\frac{x}{m}$. Y se pensó, si la catálisis por adsorción se debe a que por este hecho se concentran los productos a reaccionar en la superficie del adsorbente y, por lo tanto, esta concentración provoca el correspondiente incremento en la velocidad de la reacción, ésta la podemos deducir teóricamente, si conocemos aquélla aplicando la ley que liga ambas, es decir, velocidad y concentración. Y E. E.

(1) Para más detalles véase FREUNDLICH, *Kapillarchemie*, pág. 151, 2.ª ed. 1922.

estudiado el caso de la descomposición del SbH_3 en presencia del Sb como catalizador, y conocida la concentración de aquél en el catalizador por la fórmula de FREUNDLICH, se calculó por BONDENSTEIN y STOCK la velocidad de la reacción para la concentración encontrada, o sea el equilibrio o isoterma de la reacción para esa concentración, y la práctica da resultados en todo conformes con estos números encontrados teóricamente, es decir, que en este caso el aumento de velocidad por el catalizador se debe sólo al aumento de concentración por adsorción ejercida por él ya que van *paralelas velocidad de reacción con la isoterma de la adsorción*. Con razón se puede llamar este caso *catálisis por adsorción*. Claro que tan concluyente demostración no la podemos aplicar en el caso de las fermentaciones, por el hecho de que la cantidad de fermento (adsorbente) no la podemos conocer, pero por eso indicamos que serían muchas las ventajas de comparar fermentos con catalizadores, y esta demostración experimental de tal hipótesis aplicable seguramente a los fermentos por la semejanza entre ellos y los catalizadores, nos da la clave de lo que es probable que sea la acción fermentativa, que según las opiniones más autorizadas se reduce en la mayoría de los casos a una *catálisis por adsorción*. Claro que ya hemos visto lo variada que es la acción catalítica, y que por ahora es imposible agrupar todos sus casos bajo una misma explicación, y esto es posible que suceda también con los fermentos. Pasemos a la última parte del capítulo o sea a estudiar las

II. Analogías y diferencias entre catalizadores inorgánicos y fermentos, o sea pruebas en pro y en contra de la hipótesis que los considera análogos

Analogías

Fermentos metálicos de Bredig. Pocos catalizadores inorgánicos muestran una analogía tan grande con los fermentos corrientes como los metales al estado coloidal, hasta tal punto que BREDIG que los ha estudiado sobre todo, los llamó *fermentos inorgánicos*. Desarrollan muchas acciones catalíticas, como la aceleración de la oxidación del NH_3 por el permanganato en presencia del platino coloidal, la reducción del azul de metileno por el aldehido fórmico, etc.

Pero sobre todo tienen interés aquellas acciones catalíticas que pueden ser causadas tanto por metales coloidales como por fermentos orgánicos. Tal sucede con la descomposición del H_2O_2 que puede ser acelerada tanto por el platino coloidal como por la catalasa, fermento muy extendido en todos los organismos. Comparándolos se ve que producen los mismos efectos y que presentan grandes analogías. Estudiaremos diferentes aspectos de la cuestión.

1.° *Obran en cantidades pequeñísimas ambos.* Así el platino obra ya claramente, según BREDIG, en disoluciones de 1 gr. en 70.000.000

de litros y la catalasa obtenida, según MICHAELIS y PECHSTEIN, del hígado de vaca, conviene diluirla al utilizarla para estudiar la cinética de la descomposición del H_2O_2 al 1 por 50.000, de ésta tomar sólo algunos cm.^{3} para añadirlos al H_2O_2, téngase en cuenta que lo que diluímos al principio es el extracto de hígado de vaca, que en modo alguno es catalasa pura, sino que es muy probable que encerrará ya pequeñas cantidades de ella. Se comprende la enorme dilución que debe alcanzar cuando la utilizamos.

2.° *Ambos presentan óptimos en su acción.* De temperatura: así el platino coloidal posee el suyo entre los 55° y los 85°. Los fermentos orgánicos trabajan muy favorablemente a la temperatura del cuerpo, presentan, por tanto, un óptimo de temperatura no muy alejado de ella. También presentan ambos, óptimos de reacción del medio, así para la catalasa el óptimo es bastante extenso, oscila su valor entre *ph* casi = 9, y *ph* = 5,5 (1), para el platino coloidal BREDIG indica que su óptimo corresponde a una reacción francamente alcalina, es decir, a 1/32 N de NaOH.

Acción de venenos. Tanto el platino coloidal como la catalasa son frenados en su acción por diferentes substancias, y lo que es más extraño en el caso del platino, por venenos como el CNH. Según KOBERT, bastan 0,002 mg. de CNH en un litro para disminuir la descomposición del H_2O_2 por la catalasa de la sangre. Según BREDIG, el platino coloidal es ya sensible a la acción venenosa del CNH a concentraciones tan débiles como 1/20.000.000 de solución normal. También el SH_2 influye nocivamente sobre ambos. Es notable, sin embargo, que el CNH no solamente deja de ser « venenoso » para la catalisis del H_2O_2 por el hierro y el cobre, sino que obra favorablemente sobre ella. Naturalmente, este « envenenamiento » sólo se puede entender aquí, como resultado de una acción desviante del catalizador por el veneno. Esta desviación será quizá de orden físico, químico o mixto, como adsorción, combinación etc. Quizá la unión se verificará entre el veneno y el substracto.

Vemos cómo de esta comparación vamos deduciendo enseñanzas que nos permiten imaginar lo que debe ser la fermentación. Ya que hemos hablado de metales coloidales vamos a indicar brevemente la

Influencia del estado coloidal en la catálisis y fermentos. Sólo lo haremos brevemente, pues al final de este capítulo pensamos resumir las ideas que BAYLISS publicó en un artículo sobre este asunto en *Die Naturwissenschaften*. Ahora nos interesa ver el modo cómo se pueden explicar los óptimos indicados, partiendo de la base de la naturaleza coloidal de ambos. Se suponía que si la acción catalítica de los metales citados, era una catálisis por adsorción, el estado de dispersión del coloide variando grandemente la superficie adsortiva

(1) Para la significación de estos números, véase capítulo VIII «Concentración de iones H », pág. 132.

(véase « Adsorción ») ejercería una influencia grande en la acción catalítica. Y en efecto, BREDIG ha demostrado esto experimentalmente, viendo que el aumento de dispersión del coloide aumenta notablemente su acción catalizadora, siempre que aquél no pase al estado molecular disperso. Como sabemos que los OH iones aumentan la dispersión del platino coloidal, se comprende que el óptimo para la acción de éste sobre el H_2O_2, coincida con cierta concentración de OH iones, es decir, con determinada alcalinidad. Corresponderá a la dispersión más favorable del platino coloidal. FODOR intentó también estudiar en los fermentos orgánicos dicha relación entre grado de dispersión y acción fermentativa, pero en este caso la cuestión es mucho más compleja por no poder saber ciertamente lo que es el fermento. El cree que las partículas del fermento adsorben el substracto y el H_2O y que allí mismo se forman los H y OH iones que son los que provocan las descomposiciones hidrolíticas de aquél. Esta concepción es algo diferente de la que tienen otros que creen que en los fermentos, quizá haya dos partes, una coloidal que uniría por adsorción el substracto con la otra parte activa del fermento y que ya juntos despertándose sus afinidades químicas, reaccionan allí.

El óptimo de temperatura se comprende fácilmente sabiendo que con ella aumenta el movimiento browniano aumentando las probabilidades del contacto de las diferentes partículas entre sí y, por lo tanto, es natural que se avive la reacción. El aumento de la viscosidad, por el contrario, frena la reacción probablemente porque dificulta aquel movimiento.

Después de haber expuesto estas analogías y de ver lo mucho que ha beneficiado al problema de la fermentación, la hipótesis de su homología con la catálisis inorgánica, vamos a ver las objecciones que a tal hipótesis se han hecho, estudiando las

Diferencias aparentes entre fermentos y catalizadores inorgánicos

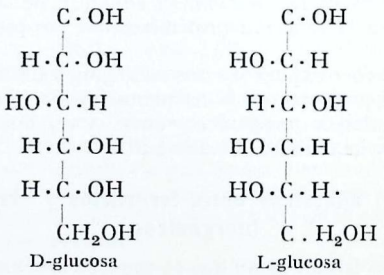
Estos últimos hemos dicho que en muchos casos obran por adsorción como tales catalizadores, y que para los fermentos tal opinión es la más extendida. Pero nos encontramos con un hecho que parece que casa mal con tal hipótesis, y es que para los fermentos existe una *especificidad* en su acción enorme y se podría suponer que la adsorción no admite la selección química que realizan los fermentos. Antes que entrar en esta cuestión hay que indicar que los metales coloidales son muy distintos como tales coloides que los fermentos. Aquéllos son *suspensoides*, es decir, por decirlo así, partículas sólidas en el medio disperso, generalmente agua y los fermentos, en cambio, son coloides *hidrófilos* o *emulsoides* (véase Parte primera para ampliar sobre estos conceptos), éstos son partículas rodeadas del líquido dispersante y embebidas por él de tal modo que ofrecen una analogía muy grande con las soluciones verdaderas, predispuestos por esto a

una facilidad de reaccionar mayor, con la substancia adsorbida, lo cual es más difícil en el caso de los fermentos metálicos.

En el caso de los orgánicos se complica, por decirlo así, la adsorción con la afinidad química, y no es de extrañar que encontremos diferencias en el modo de obrar de estas dos clases de fermentos, especialmente en la cuestión de las apetencias o repulsiones de las partículas coloidales para ciertos compuestos, es decir, en su *especificidad*. Esta cualidad es tan pronunciada en los fermentos, que parece necesario detenerse en su estudio, considerándola con respecto a los diferentes grupos químicos de los substractos.

Pasteur conocía ya este carácter de los fermentos, y lo utilizó para separar los componentes ópticos activos de los compuestos racémicos. Modernamente, ha sido sobre todo E. Fischer el que ha estudiado más a fondo esta cuestión.

Especificidad fermentativa para los hidratos de carbono. E. Fischer nos hizo conocer que los azúcares d-glicosa, d-fructosa, d-mannosa y d-galactosa son fermentescibles, al paso que la l-glicosa, l-fructosa, l-mannosa l-galactosa no son atacados por los fermentos. Los ocho citados tienen por fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$, sus diferencias radicarán, por lo tanto, en su fórmula de constitución. Para poner sólo un ejemplo copiaremos las de las d- y l-glicosa, según E. Fischer.



D-glucosa L-glucosa

Como decíamos, la primera es atacable por los fermentos y la segunda no, siendo la causa de tal diferencia la distinta fórmula estructural. Basta, como vemos, un pequeño cambio en ésta para que el fermento no pueda ya adaptarse a él. Fischer creó el símil de la cerradura y la llave para aclarar la selección fermentativa. Tal fermento se adapta a tal substracto y lo descompone, como tal llave a tal cerradura y la abre ; pero para un nuevo substracto o cerradura necesitaremos un nuevo fermento o una nueva llave.

Se puede decir, en general, que la especificidad fermentativa para el caso de los hidratos de carbono y de los glucósidos es muy grande. Así, al estudiar en otro capítulo brevemente la descriptiva de estos fermentos, hablaremos de disacarasas, de tri-tetra, polisacarasas, de glucosidasas, y dentro de los monosacarasas, distinguiremos

la lactasa, glucasa, etc., indicando tales nombres, diferentes fermentos según los substractos a que se aplican. En el caso de los polisacáridos y de los glucósidos, formados por la unión de varias especies de monosacáridos, y de otros compuestos que no son hidratos de carbono para los últimos citados, se propuso la cuestión de si cada combinación necesita su fermento, o si más bien es la presencia en su fórmula de tal o cual azúcar la que permite el ataque de la cadena por el fermento de este monosacárido. También era de interés conocer si tenía influencia, la posición del azúcar en cuestión al principio, al fin o dentro de la cadena del polisacárido, para poder ser más o menos atacado. Lo que hoy se acepta es que son necesarios varios fermentos diferentes para la descomposición total de tales cadenas. Así, si nos representamos un trisacárido formado por la unión de glucosa, con galactosa y fructosa, se cree que el ataque empezará con un fermento que se adapte al último azúcar; al quedar un disacárido será necesario otro fermento que ataque a otro de los dos azúcares que quedan, y por fin un tercero para el último monosacárido. Si además tenemos en cuenta que los monosacáridos poseen varios estereoisómeros, como por ejemplo la α y β-glucosa, y que para la síntesis y descomposición de los polisacáridos tiene gran importancia que sea la forma α ó β la existente, veremos que no sólo hará falta un fermento especial para cada especie química, sino dentro de una misma el adecuado para cada estereoisómero. Es decir, que con E. Fischer, se cree hoy que existe una extraordinaria especificidad entre los fermentos que atacan o sintetizan los hidratos de carbono, debido probablemente a una estrecha relación de configuración entre el substracto y el desconocido fermento. Pasaremos a hablar de la

Especificidad de los fermentos adaptados a los albuminoides (1). También aquí es grande tal adaptación. Precisamente desde los trabajos del mismo E. Fischer, sobre la constitución de los albuminoides y de sus piedras de construcción, los amino-ácidos y las combinaciones de éstos los polipéptidos, se ha abierto un campo inmenso para el estudio de los fermentos, sobre todo desde el punto de vista que ahora tratamos, a saber, de si son específicos o no. Júzguese de la enorme variedad de combinaciones que pueden ser sometidas a estudio, por los siguientes datos. Son 19 los amino-ácidos hoy conocidos como piedras de constitución de los albuminoides, y éstos pueden combinarse, sin límite de número, ni de orden de colocación, para formar los polipéptidos y luego los albuminoides. La imaginación se pierde cuando se quiere expresar en cifras las combinaciones posibles que resultan de barajarlas. Por eso se comprende que se diga que existen albuminoides específicos no sólo para cada especie animal o vegetal, sino para cada individuo y para cada órgano (2). Según Abderhalden

(1) Sobre amino-ácidos y polipéptidos damos en el Apéndice un breve resumen.

(2) La digestión, según el inmunólogo Hamburger (de Graz), tendría por objeto destruir la especificidad de los albuminoides alimenticios para que así el organismo pudiese en el seno de sus tejidos fabricarse los que son específicos de él.

(*Abwehrfermente*, pág. 26, 4.ª ed.), las combinaciones posibles con los amino-ácidos tomados de 20 en 20 son 2.432.902.008.176.640.000, y además se pueden tomar de dos en dos, de tres en tres, de cuatro en cuatro, etc., y todos, menos la glicocola, tienen dos formas la D y la L que separadamente pueden combinarse. Pues bien; cuando en el laboratorio se sintetiza un tripéptido, por ejemplo, nadie puede de antemano preveer si tal combinación será atacable por los fermentos y en qué forma. Así, el jugo pancreático ataca el dipéptido alanil-glicina y no el glicil-alanina ataca los alanil-alanina, leucil-glicil-glicina, glicil-tirosina, etc., y no ataca los leucil-alanina, leucil-glicina, glicil-phenil-alanina, triglicil-glicina, etc. Y respecto a la influencia del carácter óptico copiaremos el cuadro de Abderhalden (1).

Atacables por jugo pancreático	No atacables por el jugo pancreático
d. alanil-d. alanina	d. alanil-l. alanina
d. alanil-l. leucina	l. alanil-d. alanina
l. leucil-l. leucina	l. leucil-d. leucina
l. leucil-l. ácido glutamínico	d. leucil-l. leucina

Abderhalden y sus discípulos han hecho numerosos trabajos sobre este asunto, y han logrado averiguar por métodos ópticos (polarímetro) el modo cómo los fermentos rompen las cadenas de amino-ácidos. Vamos a poner un ejemplo de descomposición de un tripéptido, que será el d-alanil-glicil-glicina cuyo poder rotatorio específico es + 36°. Teóricamente puede descomponerse en un primer paso así, d-alanina por un lado y glicil-glicina por otro ; o bien, por el contrario, d-alanil-glicina y glicina. En el primer caso, como el poder rotatorio específico de la d-alanina es + 2,7, y el de la glicil-glicina 0°, pues sabemos que la glicocola es el único amino-ácido óptico inactivo ; de ser la descomposición conforme a tal tipo, el efecto del ataque del fermento será, medido en el polarímetro, un descenso grande del poder rotatorio ; en cambio, si la ruptura tuviese lugar conforme al segundo tipo, como el poder específico rotatorio de la d-alanil-glicina es + 50° y el de la glicocola 0°, el poder rotatorio aumentará mucho con el ataque del fermento. No puede romperse el tripéptido en sus tres componentes de una vez así : d-alanina.-glicocola.-glicocola, pues la experiencia demuestra valiéndose del análisis químico, que la ruptura de los polipéptidos se hace a pasos. Por estos hechos se cree que los fermentos digestivos proteo y peptolíticos, es decir, que como la pepsina del estómago y la tripsina en el intestino atacan a los albuminoides alimenticios en sus primeras fases ; y los peptolíticos que existen en el intestino y que continúan la descomposición de aquéllos atacando los polipéptidos o últimas cadenas de la descomposición de los albuminoides, no son *un solo* fermento, sino que a su vez son mezclas de varios adaptados cada uno a los sucesivos tránsitos de la des-

(1) *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, 5.ª ed., 2.ª parte, pág. 295.

composición de aquéllos (albuminoides y polipéptidos como extremos de la serie). Algo parecido deducimos en el caso de los hidratos de carbono. Existe, por tanto, una gran especificidad en el ataque de los fermentos respecto a hidratos de carbono y albuminoides, dependiente, en gran parte, de la configuración del substracto, sin olvidar que en este aspecto de atracciones y repulsiones entre el fermento y substracto, juegan un papel muy importante la carga eléctrica de los iones, de las partículas coloidales, etc., y otras características del estado coloidal.

Especificidad fermentativa en las grasas. — Sabido es que las grasas son combinaciones de la glicerina con los ácidos grasos oleico, esteárico, palmítico, margárico, etc. Casi todas las existentes en el organismo son simétricas, es decir, ópticamente inactivas, las que tienen acción sobre la luz polarizada son la excepción. Por esto se sospechó que los fermentos adaptados a este grupo no debían ser específicos, y en efecto, se ve que la lipasa ataca regularmente a las grasas más diferentes. También se extiende la acción de la lipasa a los ópticos antípodas de ciertos glicéridos, asimétricos en la molécula de glicerina. Pero aun para las grasas se observan notables diferencias en el modo cómo la lipasa realiza su hidrólisis a su síntesis. Siendo el resultado muy distinto tanto por los productos que se forman, como por la velocidad de la reacción, según sean los ácidos grasos que se combinan con la glicerina o según sea su colocación en la molécula de ésta. Parece, pues, que hay cierta especificidad en el modo de obrar.

Después de conocer el alto grado en que los fermentos son específicos en general, y habiendo dicho que hoy se los considera como catalizadores de los seres vivientes, es de interés conocer si *¿son también específicos los demás catalizadores?* Hemos explicado la especificidad de los fermentos, pensando que debe haber uniones físico-químicas de fermento y substracto. Tales uniones eran favorecidas por el estado coloidal hidrófilo del primero, estado que favorece la adsorción del substracto y la aceleración química posterior En tales adsorciones deben intervenir afinidades químicas también, y se suponía que los casos de especificidad de los fermentos más fina, es decir, aquellos en que se manifiesta una apetencia o repulsión por uno de los dos compuestos ópticos que sólo se diferencian en el modo de colocarse los enlaces en un átomo de carbono asimétrico, era una cualidad exclusiva de los fermentos, algo que separaba esencialmente la materia viva de la materia inerte, y que sólo la primera era capaz de realizar síntesis asimétricas a partir de compuestos racémicos o neutros ópticamente. Por esto el problema de la especificidad de los catalizadores inorgánicos se planteó de este modo.

¿Pueden también los catalizadores en general obrar asimétricamente? Bredig fué el que con sus investigaciones hizo desaparecer la supuesta separación entre la materia viva y la inerte en este aspecto. Citemos algunos ejemplos. Sabemos que la emulsina une el ácido

cianhídrico y el aldehido benzoico que son ópticos inactivos, pues ninguno de los dos posee átomos de carbono asimétrico para formar el compuesto *dextrógiro* nitrilo- fenilglicólico, y de éste, por su saponificación posterior, se puede obtener el ácido *levógiro* fenilglicólico. Esta síntesis asimétrica a partir de compuestos simétricos y realizada por un fermento (la emulsina), ha podido ser realizada sustituyendo este fermento por catalizadores, a saber, por alcaloides. Tales alcaloides se utilizan en estos casos como disolventes de los compuestos que reaccionan, y favorecen la reacción en un sentido o en otro. Si utilizamos la quinina, se forma al combinarse el ácido cianhídrico con el aldehido benzoico, el compuesto *dextrógiro* cianhidrina. La *quinidina* como catalizador origina el correspondiente óptico activo ácido fenilglicólico o fenilacético, como en el caso de la emulsina.

Vamos a hablar del caso del ácido llamado canfocarbónico, que en medios disolventes inactivos ópticamente, se descompone, con diferentes velocidades según el disolvente, en alcanfor y ácido carbónico.

$$C_8H_{14}\begin{matrix}CH\cdot COOH\\ CO\end{matrix} \rightarrow C_8H_{14}\begin{matrix}CH_2\\ CO\end{matrix} + CO_2.$$

Pues bien; si utilizamos un disolvente activo en el polarímetro, es decir, un catalizador activo ópticamente (ya se recordará, que es un caso típico de catálisis el realizado por un disolvente, que altera la velocidad de la reacción de los cuerpos reaccionantes en él disueltos, siempre que no intervenga en la reacción, o por lo menos que aparezca íntegro al final de ella). Si utilizamos, como decíamos, por ejemplo, la nicotina, se observa que el ácido canfocarbónico *dextrógiro* se descompone un 12 % más rápidamente que la forma levógira. Si nos valemos de la quinina disuelta en acetofenona la forma levógira se descompone 46 % más rápidamente que la dextrógira, siendo opuesta en su acción la quinidina.

Por todos estos ejemplos se ve que es posible realizar por medio de catalizadores hidrólisis y síntesis asimétricas, lo mismo que vimos para los catalizadores de los seres vivientes que llamamos fermentos.

Es notable que hasta ahora en todos los casos conocidos de catalizadores, capaces de realizar acciones asimétricas, se ha observado, sin excepción, que los catalizadores eran ópticos activos o asimétricos, lo cual ha hecho pensar que los fermentos que realizan asimismo reacciones asimétricas, deben ser a su vez ópticos activos, es decir, construídos asimétricamente. Vemos, pues, cómo el carácter de la especificidad fermentativa que al principio se creyó que era la objeción o el obstáculo mayor para aceptar la identificación de los fermentos con los demás catalizadores ha desaparecido.

Para acabar el capítulo, y después de vista la importancia que la admisión del estado coloidal como propio de los fermentos tiene para admitir la teoría actual de su acción, a saber, que ejercen una

catálisis por adsorción, parece oportuno resumir las pruebas y ventajas que el iniciador de la teoría coloidal de los fermentos, profesor Bayliss, encuentra para aceptar tal hipótesis.

III. Los fermentos como coloides (1)

1.° **Los fermentos son coloides** (2). Hoy se cree que probablemente los fermentos se presentan siempre en estado coloidal, y que este estado es algo necesario para la ejecución de su cometido, pues al perderlo dejan de ser activos. Bayliss ha realizado con numerosos fermentos la siguiente experiencia. Por medio de la ultrafiltración ha separado en los líquidos que contenían fermentos, las partículas coloidales y ha visto que el líquido filtrado resultaba inactivo; parece, pues, que el fermento debía estar entre las partículas coloidales retenidas por el filtro. Tal demostración la ha realizado para la lipasa, emulsina, invertasa, lactasa, ureasa, peroxidasa, catalasa y papaína.

Tal estado coloidal tiene como mayor ventaja el *considerable grado grande de dispersión de sus partículas que disminuyendo su volumen aumenta enormemente su superficie*. En muchos casos se ha podido realizar la comprobación directa de que la actividad fermentativa es tanto mayor cuanto menores sean las partículas a igual cantidad de fermento. Especialmente ha sido objeto de tales estudios la ureasa. Si aumentamos demasiado el grado de dispersión y las partículas llegan a hacerse tan pequeñas que alcanzan el tamaño molecular, entonces se transforma el sistema en una disolución verdadera, sin superficies limitantes entre la fase dispersante y dispersa, y, por lo tanto, sin la condición precisa para la realización de la *adsorción*, fundamento de la *catálisis*. Por esta razón pierden los fermentos, indudablemente, su acción en muchos casos al disolverse. Pero no se ha conseguido la demostración experimental de este hecho.

La gran dispersión característica del estado coloidal tiene otra ventaja para la acción de los fermentos, y es que cuanto mayor sea el número de partículas existentes, tendrán que recorrer las moléculas del substracto un camino mucho menor para encontrar una micela fermentativa. Por eso el *aumento de dispersión aumenta las probabilidades del ataque*, es decir, lo facilita. Admitiendo estas ideas, encontramos una explicación al hecho de que el *aumento de viscosidad del líquido dificulta la acción del fermento*, pues la viscosidad dificulta la movilidad de las micelas coloidales y de las moléculas del substracto. Si los fermentos no fuesen coloides, tal dependencia no existiría por tratarse ya de sistemas homogéneos. Así, en la hidrólisis del azúcar por los ácidos, la viscosidad no juega tal papel; en cambio, una diso-

(1) Para los términos técnicos, véase la Primera parte de este libro sobre Coloides.

(2) Para más detalles véase *Enzime als Kolloide*, W. M. Bayliss. Londres. *Die Naturwissenschaften*, 17, II, 1922 ; y *Das Fermentproblem*, por Andor Fodor, 1922. Dresde y Leipzig.

ponina disminuye la velocidad de la hidrólisis de la urea bajo la acción de aquel fermento. Es notable que a menor temperatura sea esta acción retardadora mayor que a elevada, pero perfectamente explicable si se tiene en cuenta que es negativo el coeficiente de temperatura de la adsorción.

En la parte de este libro dedicada a los coloides, nos ocupamos más despacio de esta propiedad tan importante para los fermentos, denominada *adsorción;* recordaremos ahora algunos datos relacionados con el problema de las fermentaciones. Al disminuir las micelas coloidales de tamaño por aumento de su dispersión hasta adquirir el tamaño de moléculas aisladas o átomos, llega a desaparecer la posibilidad de distinguir las fueras eléctricas, químicas y de cohesión, etc., con que actúan entre sí tales micelas, según parecen indicar los trabajos actuales sobre estructura de cristales. Quizá esta indiferenciación paulatina de fuerzas explique la importancia que la atracción química ejerce en la adsorción, y por lo tanto la especificidad fermentativa, que es tan difícil de explicar sin recurrir a la afinidad química. Sin embargo, ya se sabe que en modo alguno se puede aceptar que la adsorción obedeciese a causas exclusivamente químicas en el concepto de éstas que hoy admitimos, pues las leyes estoquiométricas que son el fundamento de la química clásica no son aplicables al fenómeno de la adsorción, que se rige más bien por una ley propia, la llamada (1) ley de la isoterma de la reacción de FREUNDLICH. Dijimos también que fenómenos eléctricos vienen a alterar profundamente la atracción química. Así, si el substracto fuesen partículas coloidales de almidón, por ejemplo, con cierta carga eléctrica, o si fuesen iones con la suya (los albuminoides en soluciones de cierta alcalinidad o acidez suelen estar ionizados), se comprendería con qué facilidad otras sales ionizadas, modificando la carga eléctrica de aquéllos, pueden influir en sus relaciones con las micelas también electrizadas que son los fermentos. Hemos dicho que la diálisis hace inactiva la amilasa del hígado, y que, por lo tanto, colocada ésta después de dializada junto al almidón en agua, es incapaz de realizar la hidrólisis del último; la razón debe ser que cargadas en este caso las micelas que forman la amilasa, y las de almidón con electricidades del mismo signo, se repelen; pero basta añadir una sal neutra (que es lo que seguramente hemos quitado al dializar) para que descargando de su electricidad una de las dos clases de partículas coloidales, no se repelan ya entre sí, y al juntarse, venga la reacción.

Según KANITZ y POTTEVIN, la acción beneficiosa de las sales de calcio sobre las fermentaciones producidas por la tripsina y por la lipasa, debe tener su explicación en que la tripsina y los albuminoides están cargados negativamente en solución alcalina, jugando aquí la albuminia el papel de anión. Se ve, pues, la gran parte que la carga eléctrica de las partículas reaccionantes puede tener en la adsorción.

(1) Véase en este mismo capítulo la explicación de esta ley.

El fermento puede adsorber otras muchas substancias además del substracto, sean iones, sean productos de la reacción, y por esto puede explicarse el hecho de que en las reacciones por fermentos, la disminución de la velocidad de la reacción por acumulación de sus productos resultantes, sea mucho mayor que lo que según la ley de las masas de la química clásica debía encontrarse, como dijimos con más extensión al tratar de la catálisis y del equilibrio químico. También se indicó allí que como productos de la reacción pueden aparecer ácidos o bases que alteren la concentración de los H ó OH iones, cuya influencia sobre la adsorción, sobre el grado de dispersión y, por lo tanto, sobre las condiciones de la reacción es tan grande.

Las nuevas ideas de LANGMUIR tienen también su importancia para aplicarlas a las fermentaciones. Dice que cree que la adsorción tiene lugar saturando el substracto las valencias libres de la superficie del adsorbente, con lo cual y ocupadas todas las valencias libres quedaría saturada la superficie adsorbente. El espesor de la capa adsorbida podría ser sólo el de una molécula. Hoy cada vez se tiende más a creer que sea cualquiera el poder que realiza la adsorción, debe ser verdad esta opinión, introducida por LANGMUIR, de que en cada punto de la superficie del adsorbente sólo puede colocarse una molécula y no dos o tres una sobre otra. Esta *saturación* explicaría un hecho conocido en las fermentaciones, y es que aumentando el substracto aumenta al principio la velocidad de la reacción, aunque no en proporción directa rigurosa, pero si la concentración se hace del 5 % y pasamos al 10 %, por ejemplo, no se observa aumento ninguno en la velocidad. Esto querría decir, según LAGMUIR, que con el 5 % estaba ya saturada toda la superficie activa del fermento con el substracto, trabajando a todo rendimiento que, como es natural, no podía aumentarse.

Un exceso de concentración disminuye la velocidad otra vez, pero esto ya hemos visto que probablemente es debido a que la viscosidad comienza a ser grande, advirtiéndose ya sus efectos perjudiciales; o a que el agua en esas concentraciones es peor adsorbida, y con esta dificultad se podría ocasionar una disminución del substracto en la superficie del fermento.

NORTHROP dice, oponiéndose a LANGMUIR, que la tripsina no muestra señales de saturación de su superficie ni en ella existen siquiera pruebas de su unión con el substracto. Según él, la velocidad de la reacción en este caso aumenta siempre con la concentración (en sus experiencias seguía aquélla determinando la parte no hidrolizada). Además, afirma que si la tripsina está en presencia de dos albuminoides, los dos se hidrolizan como si estuviesen solos; lo cual se opone a lo dicho antes; uno de ellos (el adsorbido) debía impedir la transformación del otro. BAYLISS contesta: 1.°, que se necesitaría comprobar tales hechos que, en efecto, parece que se oponen a todo lo que hasta ahora se había observado, y 2.°, que los albuminoides son tan complejos y poco conocidos, que es posible que las condicio-

nes en que trabaja la tripsina sean muy especiales. No excluye, por lo tanto, la posibilidad de que las leyes de las fermentaciones no sean generales, tales serían ciertas en unos casos y no aplicables en otros así, por ejemplo. Se ha dicho, como regla general, que las substancias rebajadoras de la tensión superficial, aumentan la dispersión de los coloides o sea de los fermentos, y, por lo tanto, aumentan su facultad adsorbente o sea su acción catalítica, y sin embargo, el alcohol amílico que disminuye la tensión superficial, disminuye también la acción de la ureasa, pero es porque al mismo tiempo es muy *adsorbible* a su vez por el fermento y arroja de él al substracto. Con el alcohol caprílico ocurre lo contrario.

IV. Conclusiones

Resumiremos lo dicho en el capítulo, con las siguientes conclusiones :

1.ª El organismo viviente es capaz de realizar a la temperatura ordinaria y con concentraciones pequeñas de ácidos y bases, por medio de agentes desconocidos que llamamos *fermentos*, una serie de reacciones químicas, que requieren fuera del organismo y sin tales agentes, temperaturas mucho más elevadas y reactivos mucho más enérgicos.

2.ª El estudio de los *fermentos* y su comparación con los *catalizadores onorgánicos*, ha permitido establecer la *analogía de leyes para ambos*.

3.ª De entre los modos de catálisis inorgánica parece ser que los *fermentos* se deben incluir en la llamada *catálisis por adsorción*.

4.ª Los *fermentos* se presentan en *estado coloidal*, por eso se explica que realicen la catálisis por adsorción ; y el hecho de que los *fermentos* sean *emulsoides* (coloides hidrófilos) y los catalizadores inorgánicos coloidales sean hidrófobos (suspensoides) nos explica la aparente divergencia, referentes sobre todo a especificidad que a primera vista existe entre ambos.

5.ª La gran especificidad fermentativa nos indica la *gran importancia* que la *estructura química del fermento* tiene en su adsorción selectiva y, por lo tanto, en su acción.

Además es de interés recordar las leyes y reglas más importantes que convienen a *fermentos* y a los *catalizadores inorgánicos* con los que se comparan aquéllos. Tales son : 1.ª La *reversibilidad* de la acción de ambos, es decir, que los fermentos que son *analíticos* tienen que ser *sintéticos* y *viceversa*. 2.ª La existencia de una *unión transitoria* entre *fermento* y *substracto*. 3.ª La existencia para fermentos y catalizadores de *óptimos de temperatura*, y de concentración de iones, especialmente de *iones de* H y *de* OH. 4.ª La aceleración de la reacción se realiza *sin gasto de substancia* por parte del fermento o del catalizador, y por tanto, *sin* que se pueda alterar *el equilibrio final de la reacción*, a pesar de la existencia de los llamados *falsos equilibrios finales*.

Capítulo III

Zimógenos. — Cofermentos. — Antifermentos. Zimoides. — Otras teorías sobre fermentos

Zimógenos

Es un hecho repetidas veces comprobado, que las células, en muchos casos, segregan los fermentos en un estado inactivo, y que éstos necesitan de un segundo producto para adquirir sus propiedades como tales agentes. Estas substancias, precursoras de los fermentos, se denominan *zimógenos*. La substancia que produce la activación del *zimógeno* se llama *activador* o *kinasa*. Como ejemplos más conocidos pondremos : el zimógeno de la pepsina o *pepsinógeno*, y el del fermento lab cuya activación se verifica en el estómago por medio del ClH, o sea, por iones de H ; el de la lipasa del jugo pancreático cuya *kinasa* son los ácidos biliares ; y el tripsinógeno del mismo jugo, cuya activación en tripsina se realiza por medio de la *enterokinasa* contenida en el jugo intestinal o por sales, o mejor dicho, por iones de Ca.

En ninguno de estos casos se sabe si la transformación del zimógeno en fermento consiste en una variación química, o si el activador lo que hace es crear condiciones para hacer posible que las partículas-fermento adquieran un estado físico apropiado para su activación, o que modifiquen algunas de las materias que acompañan el fermento. Todas estas posibilidades se comprobarán cuando se disponga de fermentos puros.

Willstätter hace notar que los fermentos se diferencian entre sí notablemente, cuando se comparan desde el punto de vista de su mayor o menor dependencia, de circunstancias ambientes físicas o químicas. Así, la sacarasa muestra una gran dependencia en su actividad, respecto al estado físico, de tal modo que al perder su estado coloidal pierde por completo su actividad. La acción de la lipasa pancreática depende en absoluto del sistema coloidal en que está incluída. La activación del zimógeno de esta lipasa parece descansar no en una transformación del mismo, sino en la creación, por medio del activador, de condiciones a propósito para la formación de un sistema co-

loidal que permita la adsorción simultánea de fermento y substracto. WILLSTÄTTER consiguió activar la lipasa pancreática por medio de cierta cantidad de albúmina y de Cl_2Ca, tan enérgicamente como lo pueden hacer sus quinasas naturales, los ácidos biliares en el intestino. Para la amilasa crean los iones Cl, para la tripsina los iones Ca, las condiciones precisas. Comparando la lipasa de las semillas de vegetales con la pancreática, se advierten, entre otras, estas notables diferencias. La primera es insoluble en el agua, al paso que la pancreática se disuelve en ella y en glicerina, y además aquélla no necesita activadores. A pesar de esto último, sabemos que mientras no entra la semilla en germinación permanece su lipasa inactiva, dormida, pero esto es debido, según parece deducirse de trabajos de WILLSTÄTTER, a que la lipasa debe estar unida a albuminoides que la anulan. El investigador últimamente citado, consiguió despertar artificialmente su actividad, mediante la pepsina que disolviendo los albuminoides citados, libra la lipasa y puede ésta así entrar en actividad. En la Naturaleza, al comenzar la germinación de las semillas, comienza el período activo de las lipasas.

Después de haber indicado estos ejemplos el modo cómo los activadores pueden realizar su cometido, diremos que hay dos tendencias para explicarlo. Los unos, y sobre todo ABDERHALDEN, han representado la opinión de que los activadores obran indirectamente, es decir, creando condiciones favorables, sin actuar de un modo directo sobre los zimógenos o sea sin producir, por ejemplo, modificaciones químicas en ellos.

GLAESSNER, por el contrario, dijo ya hace tiempo, que en ciertos casos, como en la activación de los zimógenos, con la ayuda de ácidos diluídos minerales, se observa una transformación tan rápida, sencilla y completa, que sólo se dejaría explicar admitiendo un proceso químico no muy complicado.

Preparados que encierren zimógenos. Se han obtenido muchos, sobre todo en disoluciones. Los primeros fueron conseguidos por LANGLEY y EDKINS que obtuvieron el pepsinógeno disuelto y lo transformaron en pepsina por el ClH. Lograron separar ambos por la propiedad descubierta por ellos de que la pepsina es destruída por los álcalis mucho antes que el pepsinógeno. Este último contenido en un extracto acuoso de la mucosa del estómago de un gato, se puede transformar totalmente en pepsina en sesenta segundos, por medio de una disolución al 1 % de ClH.

GLAESSNER obtuvo disoluciones casi puras, al parecer de pepsinógeno, dejando mucosa de estómago de cerdos, durante varias semanas en soluciones alcalinas a 40°, es decir abandonándola a la autolisis. Después separaba la mucina precipitándola por medio del ácido acético. Los albuminoides los precipitaba por el acetato de uranilo, cuyo precipitado arrastraba por adsorción el pepsinógeno. Y dejando, por fin, durante algún tiempo este precipitado con una gran cantidad de

carbonato de sodio diluído, se disolvía este zimógeno. Para purificarlo repitió este proceso de precipitación mediante el acetato de uranilo, y finalmente, concentraba esta disolución a 40°. La substancia así obtenida sólo daba muy débilmente dos de las reacciones propias de los albuminoides, a saber, un delicado precipitado con sales de mercurio y con el ácido fosfotúngstico. Deduce de ello que el pepsinógeno no es de naturaleza albuminoidea, y que, por consiguiente, la pepsina obtenida por la acción sobre él del ClH tampoco podrá serlo. Recordaremos que lo mismo cree WILLSTÄTTER para la sacarasa.

BAYLISS y STARLING encontraron que el tripsinógeno tiene propiedades absolutamente idénticas a la tripsina, aparte de la cualidad de ésta de descomponer a los albuminoides que no posee aquél.

Cofermentos [1]

La transformación de zimógenos en fermentos es *irreversible*, como hemos visto, es decir, que la pepsina una vez formada no puede volver a ser pepsinógeno ; en cambio, otras substancias que son necesarias para que los fermentos actúen y que llamamos coenzimas o cofermentos y cuya acción parecería difícil diferenciar de la de los activadores, los podemos caracterizar por estar en relaciones reversibles con los fermentos, así. El jugo activo del hígado, rico en lipasa, o el de la levadura prensada, rico en zimasa, pierden su actividad dializándolos contra el agua, el líquido exterior tras la diálisis resulta también inactivo, en cambio, juntando ambos, recobran su actividad la lipasa y la zimasa. Este proceso puede repetirse cuantas veces se quiera. Lo mismo se ha encontrado para la ureasa y para la tirosinasa de las patatas. En este caso es la ultrafiltración la que separa una parte inactiva que queda en el filtro de otra también inactiva que pasa, y ambas reunidas, como en el caso anterior forman un conjunto activo. Ya decimos en otro lugar de este libro que de la substancia muscular se puede extraer simplemente con agua algo que es indispensable para la respiración del músculo, de tal modo que separada el agua del lavado, no consume más oxígeno el músculo, y añadiéndole otra vez el agua anterior comienza de nuevo la respiración de aquél. Es curioso advertir que se puede privar, también mediante el agua, a las células de la levadura de algo que les es indispensable para la respiración, y ambos extractos, éste y el de los músculos, se pueden emplear indistintamente para devolver la facultad respiratoria de ambos.

Estos extractos acuosos resisten a la cocción son *termoestables* y se les consideró como *coenzimas*. En cambio, la substancia retenida por la diálisis o por la ultrafiltración, o por los músculos o células, en los ejemplos citados, son *termolábiles* y se considera que deben representar el verdadero *fermento*.

[1] Véase, además, en el capítulo anterior « Los fermentos como coloides ».

El nombre de cofermento lo utilizó por primera vez BERTRAND en un sentido algo diferente. Hoy por hoy se puede decir aquí lo mismo que para los activadores, y es que no se sabe de qué modo actúan. Quizá obren modificando el estado coloidal de las partículas del fermento o el medio ambiente en sentido favorable para la fermentación. Para los cofermentos debe ser éste su papel, pues en muchos casos pueden ser sustituídos por sales minerales. Por ejemplo, la diastasa del hígado, hecha inactiva por dialisis recobra su actividad añadiéndole ClNa. Otro hecho en apoyo de esta concepción del papel de los cofermentos es el siguiente: Si dializamos plasma sanguíneo o suero que encierren un fermento proteolítico contra agua destilada, el fermento pierde su actividad; si, por el contrario, el líquido exterior fuese una disolución isotónica de ClNa, entonces el fermento no se debilita. Parece evidente que la diferencia está en que, en el primer caso, la desaparición de sales neutras del suero o plasma, que hemos conseguido por diálisis contra agua destilada, provoca una variación en el estado de las partículas coloidales del contenido del líquido interno del dializador que son la causa de la pérdida de la actividad fermentativa del suero o del plasma.

Quizá la acción de los narcóticos sobre los fermentos sea de esta naturaleza. Otro hecho parecido es el siguiente: Se ha demostrado por BIERRY, GIAJA y V. HENRI, que el jugo pancreático pierde por diálisis su actividad sobre la maltosa y sobre el almidón. Añadiendo ciertas sales recobra aquél su actividad y utilizando diferentes de éstas se ha llegado a establecer que su acción se debe al ion electronegativo y sobre todo al Cl y al Br. Así, hacen de cofermentos el ClK y el ClNa al paso que el SO_4Na_2 no sirve.

Según BAYLISS, cuando el substracto es coloide también, como por ejemplo, el almidón, la inactivación por diálisis, al perder iones el fermento, podría explicarse porque las micelas coloidales del almidón del fermento (amilasa de la saliva, páncreas, hígado, malta, etc.), después de la diálisis tendrían igual signo de carga eléctrica y, por lo tanto, se repelerían; añadiendo de nuevo iones, éstos neutralizarían la carga eléctrica del fermento, o la cambiarían de signo, y entonces podría atraer el substracto e hidrolizarlo. En una palabra, los iones pueden modificar notablemente la *adsorción*, como vimos, y con ello la unión de fermento y substracto.

De la levadura desecada se pueden extraer, por medio del alcohol u otros disolventes, substancias que obran acelerando enérgicamente fenómenos fermentativos, respiratorios, etc.

En cuanto a la naturaleza de los cofermentos es también desconocida. Se supuso que podrían ser fosfatos inorgánicos los cofermentos de la fermentación alcohólica, por el hecho de que aumentaban extraordinariamente la actividad de un jugo de levadura ordinario. Pero luego se vió que no eran capaces por sí sólos de devolver la actividad al jugo inactivado por diálisis, era preciso añadir además el líquido de fuera para conseguir la activación, a su vez éste solo sin

fosfatos no basta. Serían necesarios, por lo tanto, en estec aso dos cofermentos. Muchos amino-ácidos como la tirosina, cistina, cisteína, triptófano, arginina e histidina, etc., actúan también como aceleradores de la fermentación alcohólica. Así como la adrenalina, bases púricas y sus derivados, y también productos extraídos del tiroides, timo, etc.

Antifermentos

Parece ser que hay otras substancias que, contrariamente a las anteriores, impiden específicamente la acción fermentativa. Son, según BAYLISS, análogas a las antitoxinas obtenidas de los organismos tras inyecciones en ellos de toxinas. Sabemos que hay otras substancias que no provocan la formación de anticuerpos, como sucede con las drogas en general y con las hormonas, que tienen regularmente un peso molecular menor que los fermentos y que las toxinas.

En la sangre existen normalmente antitripsina y antilab; otros antifermentos se han obtenido por inyecciones subcutáneas de las correspondientes enzimas, así se han obtenido anticuerpos contra la lipasa, emulsina, amilasa, pepsina, papaína y ureasa (1). Una interesante antitripsina encontró WEINLAND en los gusanos intestinales, cuyo papel sería protegerlos contra el jugo pancreático. HAMILL la estudió y le asigna las propiedades siguientes: Resiste a la cocción en las soluciones neutras y ácidas; pero si se hacen éstas alcalinas, su antiacción es destruída en seguida al cocerla. Es soluble en alcohol hasta de 85°, y los alcoholes más fuertes la precipitan sin dañarla. Dializa fácilmente a través de membranas coloides.

DASTRE observó que en el curso de la reacción desaparece lentamente la antitripsina. Se puede comprobar tal desaparición, añadiendo a una mezcla de tripsina y caseína la cantidad de extracto de gusanos intestinales, suficiente para paralizar la reacción entre aquéllas, se deja todo algunos días en el termostato y se observa que la tripsina recobra poco a poco su actividad. Se ha hecho la experiencia de comparar la acción de la tripsina sobre albúmina de huevo, sin y con antitripsina. La curva superior de la figura 66, representa la acción de la tripsina sobre albúmina de huevo diluída nueve veces en agua y calentada sobre 100° para destruir el antifermento. La curva inferior representa la misma acción, pero sin calentar la albúmina, por consiguiente, con antitripsina. Se ve que al principio, el antifermento estaba intacto y no había ataque, pero a medida que pasa el tiempo se advierte como desaparece el anticuerpo, y por fin la cantidad de albúmina digerida es la misma con o sin antifermento.

¿Será la acción de la antitripsina un fenómeno de adsorción? HEDIN así lo cree y dice que así como el carbón de madera *adsorbe* la tripsina, ésta es también adsorbida por el antifermento; para él, la antiacción es un puro fenómeno de adsorción. Apoya su creencia

(1) Véase, para descriptiva de estos fermentos, el capítulo siguiente.

diciendo que hay dos hechos característicos comunes a ambos: 1.° Es imposible alejar totalmente la tripsina de la solución por un exceso de antisubstancia (sea el carbón vegetal, o sea la antitripsina que hemos dicho existe normalmente en el suero). 2.° Una pequeña cantidad de antisubstancia en ambos casos, neutraliza relativamente mucha más cantidad de tripsina que una grande. Se explica por adsorción la curva inferior, sabiendo que hay dos tiempos en este fenómeno; en el primero, el fermento es cogido por el anticuerpo, pero en forma que fácilmente puede ser cedido a la caseína (paralización primitiva del fenómeno y activación posterior del fermento); en un segundo estado, el fermento es fijado de tal modo que ya no puede ser utilizado para digerir la caseína. Sin que haya una línea de separación precisa entre ambos. Davis ha observado una difusión de yodo

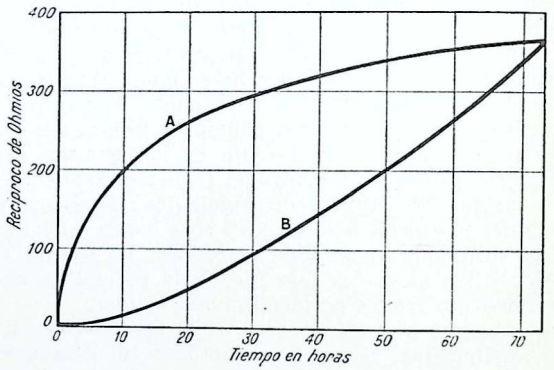


Fig. 66

dentro del carbón *(absorción)*, es posible que en el segundo tiempo suceda algo de esto, haya *absorción* del fermento por el anticuerpo: en el primero habrá quizá sólo *adsorción*. El que haya antifermentos específicos nada dice en contra de esta teoría de Hedin. Ya dijimos al hablar de los fermentos que la adsorción puede también ser específica.

Weinland dijo que en la mucosa estomacal existe una antipepsina, y estas substancias darían a estos tejidos su inmunidad contra el ataque de los respectivos jugos digestivos. Hamill atestiguó la observación en lo que se refiere a la antipepsina del estómago; pero él y Bayliss han puesto muy en duda la existencia de antitripsina en la mucosa intestinal. Según Klug, es la mucina la que se encuentra allí siempre en bastante cantidad, para que *adsorbiendo* el fermento proteja a aquellas células contra su acción. Claro que esta adsorción se extendería igualmente a otros coloides del contenido intestinal. Si a consecuencia de una inyección de secretina, provocamos una secreción abundante de jugo pancreático en el intestino vacío, entonces la mucosa se daña produciéndose descamación y hemorragias. En circunstancias normales la acidez del contenido estomacal, pasando al intestino es la que debe provocar la secreción del jugo pancreático, y al mismo tiempo es neutralizado con la elevada alcalinidad del contenido intestinal la cual es necesaria para la acción de la tripsina. Los daños antes citados del jugo pancreático sobre la mucosa del intestino vacío, se deberá también a que faltan los alimentos que *adsorben* indudablemente gran cantidad de fermento, y este fermento se hallaría libre allí en el caso de estar desocupado el intestino.

Opinión de Abderhalden sobre todos estos cuerpos

Dice así: « No hay duda que acerca de la cuestión de la existencia de activadores, cofermentos, aceleradores, retardadores, etc., de las fermentaciones, y acerca de la esencia y modo de obrar de estos productos, sólo se podrá contestar con seguridad, cuando se tengan disponibles para estos estudios fermentos libres de toda otra substancia. Es fácil que entonces se encuentre que la aceptación de «cofermentos », es decir, de substancias con una denominación y características especiales, está de sobra. Se trata, quizá, de productos de naturaleza completamente conocida, bajo cuya influencia se crean ciertas condiciones indispensables para la acción fermentativa. En este sentido, es de interés anotar que se ha discutido la existencia de un cofermento especial para la tirosina. Más bien parece ser el tal cofermento una determinada concentración de iones OH. Por la diálisis alteraríamos fácilmente el óptimo de la reacción al variar esta concentración. »

Zimoides

Bayliss creó este nombre en vista de ciertos hechos que parece ser que apoyan la teoría de Ehrlich, la cual atribuye la tendencia a la unión y la actividad fermentativa, a la función de determinadas *cadenas laterales* en el complejo que constituye el fermento. Tales observaciones son: Korschum, estudiando las relaciones entre el lab y sus anticuerpos, observó que por medio de la filtración de una solución de lab con su anticuerpo a través de arcilla porosa, se separan según los momentos de la filtración varias porciones, en las que aquellas dos substancias están en diferentes concentraciones; diluímos entonces las más concentradas, hasta igualar a todas, y parece que entonces la acción coagulante de cualquiera de las porciones sobre la leche debía ser la misma ya que todas poseen la misma concentración de lab y de anticuerpo, y no es así. Estudiando mejor tal extraño proceder, creyó que era debido a que la solución primitiva que él filtraba encerraba una parte en una forma modificada del fermento, que Bayliss llamó *zimoide*, por analogía a los *toxoides* de-

EHRLICH. Este *zimoide* sería capaz de juntarse al anticuerpo, perdiendo entonces su acción coagulante. Por eso, al filtrarse los tres cuerpos zimoide, fermento y anticuerpo en diferentes proporciones, aun cuando la concentración total fuese idéntica, la relación entre los tres componentes no lo era, y por eso el zimoide podría anular más o menos anticuerpo y hallarse el fermento libre para coagular la leche en diferente cantidad. BAYLISS ha observado modificaciones de la tripsina análogas, y las obtenía calentándola durante un día sobre 25°, y propuso el nombre de zimoide. También BEARN y CRAMER han hecho experiencias interesantes sobre esta materia.

A propósito de estos estados en que los fermentos aparecen inactivos, y de la existencia de anticuerpos para los activos, dice ABDERHALDEN que es necesario tener en cuenta que también el *substracto* puede estar *inactivado*, y que, por lo tanto, no conviene generalizar aquellas ideas demasiado, y cita el caso siguiente: Se sabe que las mucosas estomacal e intestinal resisten a la acción de los jugos gástricos, pancreático e intestinal; tal resistencia se atribuyó desde el primer momento a la presencia de antifermentos segregados por las referidas mucosas, sin tener prueba ninguna de su existencia. Lo único que se sabe es que mientras esas células viven normalmente no son digeridas. No se sabe si tal resistencia a la digestión se debe a la acción de antifermentos (véase lo dicho acerca de la antitripsina y antipepsina) o de otras substancias, mucosas, etc., o si simplemente tal resistencia depende de una variación en la configuración del substracto celular o de su estado, inherentes a la vida de las mucosas. En una palabra, es muy posible que el fermento no pueda atacarla, porque también el substracto puede estar « inactivado ».

Otras hipótesis y caminos propuestos para resolver el problema de los fermentos

Hemos indicado que actualmente son mayoría los que creen que las fermentaciones son un caso particular de la catálisis la llamada *catálisis por adsorción*, y que esta orientación es una de las que se siguen para resolver este problema. También se dijo que la naturaleza coloidal de los fermentos con las propiedades características de este estado eran un dato importante para la aceptación de tal hipótesis. Siendo un hecho, que no debe perderse de vista, el que a pesar de lo lejos que se ha llevado la purificación de determinados fermentos, no se ha conseguido de modo indudable obtener en estado activo ninguno en forma no coloidal. Por esto parece que tal estado es algo esencial para su acción, aunque se podría sospechar que lo coloidal fuesen las substancias que acompañan al fermento el cual, puro, podría ser molecular. Pero como de todo esto se trata en otro capítulo, trataremos aquí de otros caminos e hipótesis propuestos para orientar este problema.

Orientaciones predominantemente químicas. Para muchos, todavía, el conocer la estructura química de los fermentos, es la cuestión fundamental del problema. En primer término, entre las tentativas realizadas con este objeto, debemos colocar los trabajos de WILLSTÄTTER para obtener *fermentos puros*. Esto sería condición previa para la aclaración de su composición. Ya indicamos que para limpiarlos de las substancias que los acompañaqan, utilizaba el procedimiento de la adsorción. Escogía los adsorbentes más simples y de cualidades conocidas, que condensaban en su superficie con preferencia los fermentos quizá con alguna impureza. Filtrando luego obtenía el fermento adsorbido, y separado del resto del líquido primitivo con muchas impurezas, que pasaba a través del filtro. Recogía aquél, y entonces tenía que libertar el fermento del adsorbente por medio de un disolvente apropiado, y someterlo a nueva adsorción para separar según conviniese fermento o impurezas. Ha conseguido por este procedimiento obtener preparados muy limpios de sacarasa, de cuyas propiedades nos ocupamos en otro lugar (capítulo IV). También ha purificado mucho las lipasa, tripsina y diastasa. Este método puede continuarse mientras el fermento no comience a disminuir en energía fermentativa; cuando tal ocurre es indicio de que empezamos a separar algo que es indispensable o que forma parte integrante de aquél y no se puede continuar. Observó, además, que las propiedades del producto variaban según el estado de limpieza, por eso no hay que dar un valor demasiado grande a los datos referentes a óptimos de temperatura, de reacción, etc. Por eso también huelga hablar de la cuestión de si tal fermento es ácido o base, pues siempre debemos pensar que aun los preparados más limpios obtenidos por WILLSTÄTTER, no están completamente libres de impurezas y que al despojarlos de ellas pueden variar sus propiedades.

Otra orientación se observa en los *trabajos del profesor sueco* H. v. EULER, el cual parte del supuesto de que los fermentos son compuestos de composición, estructura y configuración químicas determinadas. Cree que tal agrupación atómica o función química de ellos son las que entran en relación con tal otra del substracto, y ya unidos ambos vendrían modificaciones ulteriores del último. La unión de ambos se haría según él por afinidades químicas. Se podría hablar hasta de valencias parciales de los fermentos. En este orden de ideas buscaba si tal o cual agrupación funcional era la que predominaba o realizaba esta u otra acción del fermento. Y para ello sometía uno de éstos, de acción ya conocida, a la acción de un agente que reaccionase con el grupo atómico a investigar, por ejemplo: un agente que tuviese conocidas apetencias por los grupos funcionales aldehídicos, acetónicos, etc., y observaba si el fermento había perdido o no en su facultad como tal.

Pero no trabajando con fermentos puros, es difícil saber si al pretender tratarlos así lo que en realidad modificamos es una de las substancias que le acompañan, etc.

También se ha pensado en utilizar *medios indirectos para sintetizarlos*. Partiendo también de la base de que lo interesante en los fermentos es su composición química, se ha buscado si determinadas substancias podrían tener influencia sobre la formación de ciertos fermentos. Es decir, se ha tratado de averiguar las partes de nuestros alimentos que como piedras de construcción contribuyesen a integrar aquéllos. Pero se comprende en seguida lo excesivamente complicada que resulta la relación entre la composición de la alimentación y la vida celular íntima para poder sacar conclusiones de ella. Estas substancias que, en efecto, se encuentran, que provocan un aumento en la producción por ciertas células de tal o cual fermento, pueden hacerlo espoleando simplemente, *in toto* la actividad celular.

En las células hemos dicho que existen los fermentos correspondientes a los compuestos que allí existen almacenados; es decir, que donde hay hidratos de carbono habrá los fermentos capaces de descomponerlos y que probablemente los han sintetizado; por eso se pensó si aquéllos tendrían composición parecida al substracto, o sea que los fermentos que descomponen hidratos de carbono serían también hidratos de carbono o cercanos a ellos. Pero nada se sabe en concreto respecto a esta pretendida dependencia de configuración entre ambos.

Orientaciones deducidas de los conocimientos sobre inmunidad. Se sabe que por medio de inyecciones parenterales de soluciones con fermentos, en muchos casos se producen anticuerpos que paralizan la acción de aquellos. Inyecciones subcutáneas de lab producen en el plasma del animal, substancias anti-lab. Del mismo modo se ha logrado obtener anticuerpos contra la lipasa, lactasa, amilasa, inulasa, pepsina, tripsina, ureasa, fibrino-fermento, tirosinasa y laccasa; pero en ningún caso se ha podido demostrar que lo que se ha formado es efectivamente un antifermento específico. Solamente se sabe que se han producido allí condiciones que obran oponiéndose a la acción del fermento inyectado. Pero la causa de esta contraacción puede ser variadísima. Dice ABDERHALDEN que es muy fácil que no sea el mismo fermento, sino sus impurezas coloidales, sobre todo los albuminoides que le acompañan, los que provocan la formación de influencias frenadoras de la acción fermentativa. Se sabe que la inyección parenteral de albúmina da ciertas propiedades particulares al plasma sanguíneo. Este produce con las disoluciones de la albúmina inyectada floculaciones, precipitados, etc. Quizá a fenómenos semejantes podría achacarse la acción antifermento del plasma. Siempre hay que volver a repetir que tal camino podría ser últil si dispusiésemos de fermentos puros para provocar la formación de sus anticuerpos. La influencia de ciertas condiciones, probablemente físicas, se advierte con la observación de que una temperatua de 56° a 60° basta para anular acciones proteolíticas del plasma, y que añadiendo entonces suero, libre de proteasas y pectasas, pero no calentando aparece de

nuevo la acción proteolítica de aquél. El fermento como tal no había sido alterado al principio, sólo se había modificado probablemente el estado de las proteínas del plasma y tal cambio impediría quizá, sólo mecánicamente, la unión del fermento y substracto, como lo prueba el hecho de que añadiendo suero sin fermento y sin calentar, restablecemos las condiciones favorables y aparece la acción de aquél. Al hablar de los antifermentos, decíamos que las condiciones favorables se refieren al fermento, al medio y al substracto y que es necesario tener en cuenta que éste también puede estar «inactivado».

Acción de venenos. PETER RONA estudió la acción de «venenos de fermentos» sobre ellos mismos, para ver si podía distinguir entre sí fermentos parecidos y si se podía sacar alguna conclusión de ello. Encontró que la lipasa del plasma sanguíneo es mucho más sensible contra la quinina que la lipasa obtenida de las células hepáticas. Pero estos venenos ¿obran sobre los fermentos o sobre las impurezas? Es más, en vista de todas estas consideraciones, se puede uno preguntar:

¿Existen fermentos con estructura y propiedades definidas? Quizá sean substancias muy conocidas, como amino-ácidos, peptonas, etc., las que desenvuelven las actividades fermentativas. Lo que hace aparecer a éstas son condiciones favorables, bajo las cuales tales substancias entran en contacto con el substracto. Así, los ésteres de ácidos grasos con la glicerina son saponificados por álcalis, basta añadir lipasa y se acelera enormemente la reacción. Este es un caso más, muy claro, de que el fermento acelera sólo la reacción ya en marcha. Bastaría sustituir la lipasa por otra materia conocida, que crease condiciones semejantes para tener un ejemplo más de sustitución de fermentos por catalizadores que obrasen para los efectos como la lipasa. (Véase sobre esto en el capítulo anterior «Fermentos metálicos» y «Fermentos como catalizadores».)

Adaptación de los fermentos. Ya que hemos hablado de sustituciones, parece oportuno citar el hecho de la adaptación de ciertos organismos a tal o cual alimento. Así, la galactosa entra en fermentación con la mayoría de las especies de levaduras, aunque muy lentamente con muchas de ellas. Si se obliga a éstas, sin embargo, a descomponer este azúcar por no poner a su disposición otro, se observa una adaptación a este substracto, tal que la galactosa es, al fin, tan fácilmente digerida por la levadura así adaptada, como podría serlo la glucosa. Esto nos induce a preguntarnos si los fermentos de nuestros jugos digestivos no se dejarán influir por la clase de alimentos. Ya se dijo que las diferencias en el contenido del lab del jugo gástrico del hombre, probablemente se deben a las variaciones del régimen alimenticio.

¿Serán los fermentos materiales radioactivos? Partiendo de la idea aceptada por algunos, de que los fermentos no son compuestos

químicamente definidos, sino más bien que diferentes substancias les comunican sus propiedades, que al fin y al cabo son las características del fermento, se ha expresado por DE JAGER y ARTHUS la hipótesis de que al hablar de fermentos se trata más bien de propiedades que de cuerpos, y así la acción podría ser realizada a distancia. La experiencia que pareció apoyar esta opinión es la siguiente : Se preparó una disolución de pepsina en ácido clórhídrico, y se llenó con ella un saquito de pergamino (dializador), como líquido exterior se tomó una disolución de ClH de la misma concentración que la interna. Después se echaron en ambos líquidos pequeños cubos tallados de albúmina coagulada y se colocó todo a 38° durante algunos días. Los autores citados afirman que advirtieron digestión de la albúmina dentro y *fuera*. Como la pepsina no pudo atravesar el pergamino por ser coloide, si hubo digestión en el contenido exterior, fué debida a una acción de aquélla a *distancia*. BAYLISS repitió este interesante experimento y no halló absolutamente ninguna digestión de los cubitos de albúmina coagulada de fuera. Dice que efectivamente el líquido exterior presentaba la reacción del Biuret, pero esta reacción la podían provocar los productos de la digestión de los albuminoides de dentro, cuyos productos ya sabemos que atraviesan el pergamino. Añade, que la falta de la experiencia debe ser que los saquitos debían estar en malas condiciones, es decir, quizá con pequeños orificios. BARENDRECHT opinaba, análogamente, que las enzimas actuaban como substancias radioactivas, y que como tales sus actividades químicas eran atribuibles a radiaciones.

Algo semejante es la teoría encerrada en las *ideas de* LIEBIG y, *sobre todo, de* NAGELI. Los cuales decían que los fermentos se caracterizaban por un vivísimo movimiento intramolecular, cuyas oscilaciones en determinadas condiciones de « resonancia » podían ser transmitidas a otras moléculas, y que éstas, debido a este vivo movimiento interno se descompondrían. ROSENTHAL intentó imitar estas vibraciones hipotéticas del fermento por medio de campos magnéticos oscilantes, en los cuales introducía diferentes soluciones y pudo hacer la curiosa observación de que determinadas substancias sólo se descomponen bajo la influencia de una determinada velocidad oscilatoria, es decir, bajo la influencia de una frecuencia característica de oscilaciones, por la unidad de tiempo o de múltiplos de esa frecuencia ; así, el almidón necesita una frecuencia de 440-480, la albúmina de 320-360. Es evidente, por lo que se ve, que en estos casos era la oscilación una circunstancia para tener en cuenta, pero no parece que pueda aplicarse esto a todos los fenómenos catalíticos y fermentativos, ni que sea la vibración la causa primordial, sino, como decíamos, una condición coadyuvante a la fermentación.

Hipótesis de Michaelis. Estudiando la gran influencia de la concentración de iones H y de hidroxiliones en la fermentación, llegó a suponer que el papel de los fermentos era mantener el óptimo de concentración de tales iones en cada caso. Suponía que el fermento se disocia, y del estudio de las curvas representativas de la acción del fermento en diferentes estados de concentración creía poder deducir que en algunos de los casos (*invertasa*) es la parte no disociada la que desenvuelve la aptitud fermentativa ; en cambio, en el caso de la *tripsina* serían los aniones de la parte disociada lo activo. El papel del fermento sería, como queda dicho, producir este estado de disociación, correspondiente al óptimo de concentración de los iones de H y de OH. Pero es evidente que, de ser tal teoría cierta, este óptimo de concentración *debía ser constante* para *un fermento* dado, por ejemplo, para la tripsina, etc., ya que tal circunstancia es la señal de que la disociación del fermento sería la óptima, es decir, aquella que produjese la mayor cantidad posible de la parte activa del fermento, y *desde luego independiente del substracto*. Pero ABDERHALDEN y FODOR demostraron que no es así, puesto que con el mismo fermento varía el óptimo de concentración de iones H según el substracto.

Para acabar esta breve reseña de hipótesis sobre la materia de que tratamos, parece oportuno traducir los párrafos que a este asunto dedica ABDERHALDEN en su libro (*Physiologische Chemie*, pág. 396, 5.ª ed., 2.ª parte) y que revelan el modo de pensar de tan autorizado maestro. Dice así : « La aceptación de la existencia de fermentos es, como repetidas veces hemos dicho, una pura hipótesis. Vemos que en las células de los organismos se verifican reacciones en condiciones que no podemos reproducir en el tubo de ensayo, si no es añadiendo constituyentes celulares. Si queremos, sin los últimos, obtener los mismos resultados, tenemos que echar mano de condiciones completamente diferentes. Pero sabemos que por medio de catalizadores podemos verificar reacciones en muy distintas circunstancias que sin ellos, por ejemplo, a una temperatura muy inferior que en su ausencia. Por eso deducimos, por analogía, la conclusión de que también las reacciones celulares deben verificarse por el intermedio de catalizadores o fermentos. Puede ser esta opinión cierta, pero necesitamos en cada caso la prueba evidente. En todos los terrenos de la Biología nos encontramos con circunstancias inciertas, y en cuanto nos falta la base segura aparece una rica flora de opiniones e hipótesis. Y en ningún caso como en éstos es necesario limitar rigurosamente lo desconocido de lo demostrado sin género de dudas ».

Capítulo IV

Los fermentos en el organismo

Distinción entre fermentos y hormonas. Claro que no cabe la confusión; pero como en el lenguaje vulgar a veces se usan como sinónimos, parece oportuno repetir las diferencias entre ambos. Las *hormonas* son substancias *específicas* para cada glándula, según parece demostrarlo el hecho de que en algunas se han aislado substancias características, por ejemplo, la *adrenalina* de las cápsulas suprarrenales, la *thyroxina* (que no hay que confundir con el amino-ácido de nombre parecido, tirosina) del cuerpo tiroides. Y así decimos: tal órgano segrega tal hormona. Además, influyen en pequeñas cantidades en la *función* de otras células del cuerpo, sin servir de material para su formación.

Los *fermentos*, por el contrario, modifican reacciones químicas, ya en marcha en cuanto a su velocidad, y no influyen directamente en funciones de otras células, y además no son segregados cada fermento por una glándula especial; bien por el contrario, sabemos que todas las células son capaces de segregar muy variados fermentos y análogos a los de otras.

Descripción de los fermentos. Para ello, vamos primero a *clasificarlos* exponiendo cuál es hoy el más aceptado.

Criterio para la clasificación de los fermentos (1). Desconocida como es la naturaleza de los fermentos, tendrá que ser provisional la clasificación que se haga de ellos. Se suele escoger como punto de partida para ordenarlos, el modo de su acción, es decir, si obran oxidando, hidrolizando, etc., y luego, dentro de los incluídos en estas grandes divisiones, se atiende para denominarlos al substracto; así, hablamos de la sacarasa cuando nos referimos al fermento que actúa sobre la sacarosa, etc.

Encontramos *primero*, un grupo de fermentos que descomponen ciertos complejos en otros más sencillos, previa la adquisición de una o varias moléculas de agua se les llama fermentos *hidrolizantes* o *hidrolasas*. Como hemos dicho en el capítulo anterior que el fermento

(1) Seguimos en este capítulo la clasificación de Abderhalden en su libro *Physiologische Chemie*, 2.ª parte, 5.ª ed.

que realiza una descomposición ejecuta también la síntesis correspondiente, estas hidrolasas serán capaces, según las condiciones, de reunir los productos de la descomposición, formando el compuesto primitivo, con desprendimiento de una o varias moléculas de agua; en este caso el nombre que les cuadraría sería el de deshidrolasas, pero no se utiliza tal denominación porque sabemos que hidrolasas y deshidrolasas son el mismo fermento para cada complejo.

Un *segundo* grupo lo forman las *oxidasas* o *reductasas*, llamados también fermentos respiratorios. Luego vienen las catalasas, tan extendidas en los tejidos de los organismos, y por fin las *zimasas*, que provocan las llamadas de antiguo fermentaciones, como, por ejemplo, la alcohólica (1) sin adición ni substracción de nada.

Es indudable que esta clasificación es provisional como hija del estado actual de indecisión respecto a la naturaleza de los fermentos; pero cuando se conozcan mejor, se clasificarán también mejor, tomando una base más científica. Es fácil que en las clasificaciones futuras se encuentren juntos fermentos que hoy separamos, y viceversa.

Hidrolasas

Son fermentos que, como hemos dicho, descomponen o sintetizan ciertos compuestos con adsorción o desprendimiento de agua.

Dónde se encuentran. Podemos establecer esta regla general: Siempre que encontremos en una célula un compuesto, existirá allí el fermento correspondiente capaz de descomponerlo o de sintetizarlo. Cabe preguntarse: ¿Cómo es que encontramos en el organismo animal productos como pelos, uñas, fibras conjuntivas, etc., y en el vegetal celulosa, almidón, etc., resistentes a la acción de fermentos que están junto a ellos? ¿Es que estos productos no deben su formación a la existencia de fermentos adecuados? Lo más probable es que sí; es decir, que como otros muchos productos orgánicos, hayan tenido un origen intervenido por fermentos. Lo que debe suceder es que tras de su síntesis quizá venga un cambio de orden acaso físico, en todo caso desconocido, que haga a estos compuestos completamente extraños al fermento que intervino en su origen y que, como hemos dicho, podría también descomponerlos, o que lo sintetizado sea un isómero no atacable (Armstrong). Un pequeño cambio químico en la molécula del compuesto sintetizado, un agrupamiento de ella con otra, etc., puede hacerlo inatacable por el fermento que contribuyó a su síntesis, y sólo después de un proceso inverso podría el mismo atacarlo o descomponerlo.

(1) Para evitar repeticiones, observaremos aquí que siempre que en este trabajo digamos fermentos que descomponen o que oxidan, etc., tal substancia, deberíamos decir fermentos que sintetizan o reducen, etc., y descomponen u oxidan, etcétera, tal substancia, y viceversa. Solamente por ahorrar, suprimiremos a menudo una de las dos expresiones.

Por hidrólisis se pueden descomponer los hidratos de carbono, las grasas, los albuminoides, etc. ; por eso distinguiremos varios grupos.

Hidrolasas actuando sobre hidratos de carbono o carbohidrasas. Según el grupo a que pertenezca la substancia atacada, incluiremos al fermento correspondiente en las di- tri- tetra, etc., polisacarasas. Llamaremos glucosidasas a los fermentos que descomponen o sintetizan los glucósidos.

Sobre su especificidad. Ya indicamos algo en el capítulo anterior, ahora añadiremos que los di- tri- etc., polisacáridos, están formados por la reunión de muy diferentes clases de azúcares, hexosas, pentosas, etcétera, y cabe proponerse la cuestión : si cada polisacárido en general tendrá su fermento, o si es tal o cual componente de la molécula del mismo el que determine su atacabilidad por tal o cual fermento. En el primer caso. sería la estructura y configuración total de la molécula lo que determina la selección por el fermento. En el segundo, sería tal o cual componente, quizá en esta u otra posición (principio o final de la cadena), el que determina su atacabilidad. Por ejemplo, un trisacárido formado por la glucosa, galactosa y fructosa puede ser atacado por un fermento *in toto*, o por el contrario, podemos pensar que un fermento que ataque a la fructosa empieza la descomposición por el fin de la cadena en este caso, y deja un disacárido que será luego atacable por una glucosa o galactosa. Es más, sabemos que algunos monosacáridos, por ejemplo, la glucosa, poseen estereoisómeros (formas α y β) y cada uno requiere su fermento apropiado, complicándose más con esto la cuestión de la especificidad de las carbohidrasas. No sabemos si la descomposición se hace paso a paso o saltando de una vez en trozos las cadenas, y las mismas cuestiones se presentan al hablar de las síntesis. Por esto, todo lo que se dice respecto a especificidad son conjeturas más o menos verosímiles. Hablamos de maltasa, por ejemplo, y con ese nombre entendemos una secreción o jugo de células de tal o cual modo preparado que puede descomponer la maltosa en dos moléculas de glucosa. Probamos este mismo jugo para ver si descompone otro polisacárido o glucósido y vemos que, en efecto, lo descompone. ¿Se podría deducir de esto que la maltasa no es específica? Claro que no. El jugo usado no es maltasa pura, puede ser mezcla de varios fermentos y de otras substancias. Así, que mientras trabajemos con jugos y substancias desconocidas, mientras no se consiga obtener fermentos aislados en estado de pureza, no se podrá dar una contestación categórica a estas cuestiones de especialidad fermentativa. Existen, sin embargo, hechos, como el de que un jugo ataque tal compuesto y no su esteroisómero, que hablan claramente en pro de la aceptación de una gran especificación del fermento o fermentos contenidos en aquel jugo, y de una adaptación de fermento a substracto muy grande, como la llave a su cerradura, según expresión de E. Fischer. No existen, por el contrario, hechos que puedan categóricamente hacernos desechar tal hipótesis, ya que siempre les quitará valor el que no se trabaje con fermentos puros. Hay, además, otra razón en pro de la especialización de estos agentes, y es que con las mismas piedras de construcción (Baustеinen), es decir, con los mismo elementos, sean monosacáridos u otros, se sintetiza en unos casos este complejo y en otro caso aquél. Siendo las condiciones ambiente idénticas, debe ser tal o cual fermento el que favorece en un caso la formación de tal complejo y tal otro fermento el que favorece la síntesis de un complejo diferente. Para acabar, diremos, que hoy se admite una especialización muy grande en el trabajo de las carbohidrasas.

Descriptiva de diferentes fermentos

Comenzaremos por los *disacáridos*, siendo los más interesantes la maltasa, lactasa, sacarasa, invertasa y celobiasa.

Maltasa. Se utiliza, ordinariamente, en los laboratorios como fuente de ella, la levadura (sacaromices [1]) que después de muertos o triturados mecánicamente la dejan pasar al agua ambiente). Poco estable, posee un óptimo a 40°. Debe existir en todas las células vivientes, tanto animales como vegetales. Existe en la saliva, jugos pancreáticos e intestinal y en la sangre. Descompone la maltosa, disacárido frecuentísimo que aparece como producto de desintegración de muchos polisacáridos, almidón, glicógeno, etc.; por eso decíamos que la maltasa debía existir en todas las células. Según Willstätter y Steibel, la maltosa puede fermentar directamente sin previa descomposición en sus componentes. Parece ser que no son del todo idénticas las maltasas procedentes de diferentes orígenes, algunas tienen una acción un poco más extensas que otras.

Lactasa. Descompone la lactosa (azúcar de leche) en una molécula de glucosa y una de galactosa. Pero suele llamarse lactasa a todo fermento que actúe sobre el azúcar de leche. Entendiéndolo así existe con gran abundancia en las plantas, aunque no es seguro que todos ellos descompongan en la forma dicha al azúcar de leche. Como para la maltasa, podemos decir que las lactasas procedentes de diversos orígenes deben ser algo diferentes. Así, la lactasa obtenida de los granos de kefir, es paralizada en su acción (desviada) por la galactosa, la obtenida de almendras por la glucosa lo mismo que la procedente del organismo animal. Esto nos indica que ambas lactasas deben atacar al azúcar de leche en los dos sitios posibles. Quizá los sacaromices sean capaces de hacer fermentar la lactosa sin descomponerla en sus dos monosacáridos, previamente, como dijimos para la maltosa. En los animales jóvenes se encuentran en el intestino, en los adultos no. Debido a que con la desaparición del régimen lácteo no hace

[1] Para detalles para su obtención, como para la de varios otros que aquí se describen, véase, en el Apéndice de este libro, « Obtención de fermentos ».

falta más, por no entrar en el organismo adulto la lactosa. Es posible que con régimen lácteo prolongado se consiga en el adulto la aparición de lactasa en la secreción del páncreas.

Celobiasa. Descompone la celobiosa en dos moléculas de glucosa. Procede de las plantas y parece ser que los preparados de diferente origen, son algo distintos en su modo de obrar.

Sacarasa o invertasa. Hidroliza el azúcar de caña, en glucosa y en fructosa (inversión). Abundantísimo en las plantas, parece ser que sólo existe en los animales en la mucosa intestinal y aquí en gran cantidad. En los laboratorios, su origen casi exclusivo son las células de la levadura, que la desprenden en seguida que están un poco dañadas. La de esta procedencia pierde su acción si se la calienta de 60° a 70°. La sacarasa de la mucosa intestinal es más sensible al calor. Es curioso que calentando más aquélla, hasta 90°-100°, recobra su acción, por lo menos en parte. Resiste mejor la temperatura en presencia del azúcar de caña o de fructosa, ambos azúcares protegen la sacarasa de la acción venenosa de ciertos metales, todo esto debe tener su explicación en una unión del fermento con el azúcar.

Sobre ella se ha investigado mucho y al hablar de los procedimientos de limpieza de fermentos, citamos los trabajos de WILLSTÄTTER sobre la sacarasa y dijimos que este sabio utilizaba la propiedad que poseen muchos adsorbentes de recogerlo en su superficie y, según las condiciones existentes, de dejarlo otra vez, y así lograba separarla de otras substancias que no eran adsorbidas y viceversa.

WILLSTÄTTER describe el preparado de sacarasa así obtenido, como sigue : Se disuelve en agua fácilmente y sin dar coloración ninguna.

No da ninguna reacción de los albuminoides ni de sus productos de descomposición. Retiene enérgicamente productos gomosos de la levadura, pero se llega a limpiarla de ellos en absoluto, faltando al final todas las reacciones propias de esas substancias. No se puede encontrar tampoco en el producto preparado ningún otro hidrato de carbono. Parece que existe una dependencia entre la riqueza en ácido fosfórico y la actividad del preparado, habiéndose llegado a obtener preparados activos con un contenido de 0,006 % de fósforo. Pero con mayor proporción de *ph* aumenta su actividad. Las cenizas del preparado se han podido disminuir en las sacarasas más limpias del 44,8 % al 3 %. El nitrógeno se halla en cantidad del 4 % referido a la substancia, descontada la ceniza. WILLSTÄTTER deduce de sus investigaciones que la sacarasa consiste en un *complejo coloide, cuyo grupo activo obra sólo químicamente.* A pesar de que este producto era el fermento más limpio obtenido hasta la fecha de la publicación de estos trabajos (1922), y por eso es interesante dar los detalles citados, no podemos en modo alguno decir que se trata de un fermento puro, esto es, limpio de substancias que nada tengan que ver con su acción característica. Por eso, al hablar de óptimos de

reacción del medio, de temperatura, etc., no podemos decir si la influencia de estas circunstancias obra creando realmente un óptimo para la acción del fermento en sí o si actúan sobre las substancias que le acompañan modificándolas en forma que creen un medio, el más favorable para la acción del grupo activo propiamente dicho, y viceversa. Puede, por ejemplo, una variación de la temperatura o de la reacción coagular uno de estos productos acompañantes, y este coágulo aprisionar el fermento, anulándolo mecánicamente. Por eso se debe andar con sumo cuidado, al hablar de las causas de inactivación de fermentos y de tantas otras cuestiones, como acción de venenos, especificidad, etc., mientras no se trabaje con productos puros. Se atribuyó a la sacarasa, por su modo de obrar, un carácter ácido, aunque el preparado obtenido no ofrecía carácter ninguno electronegativo. Se puede estabilizar la acción del preparado por la acción de substancias como cloruro cálcico, productos gomosos de la levadura, los cuales obran probablemente como « Schutzcoloides », es decir, estabilizando el estado coloidal de la sacarasa. Esta se conserva bien en glicerina.

Otras carbohidrasas. Se conocen otros fermentos de este grupo, pero no de tanto interés. Tales son: la *trehalasa, melibiasa, amigdalasa, genciobiasa,* etc., cuyos nombres indican el disacárido sobre que actúan.

Diastasas. Al estudiar la descomposición de los polisacáridos se ha podido comprobar que deben ser varios los fermentos que tienen que actuar sucesivamente, para llegar a descomponerlos en los monosacáridos que los forman. Sabemos, además, que hay muchos polisacáridos que aparentemente son unidades químicas y que, sin embargo, son mezclas de otros compuestos. Tal sucede con el almidón. Las *diastasas* son los fermentos que descomponen tales agrupaciones, almidón, glicógeno, etc., transformándolos en dextrinas. Antes se les llamó amilasas, pero como quiera que no descomponen sólo el almidón, sino también otros cuerpos parece más oportuno conservar el nombre indiferente de *diastasa.* Quizá hay fermentos para el almidón y sus productos por una parte, y para el glicógeno y sus derivados por otra. Y que de haber amilasas sean éstas mezclas de fermentos para que actúen sobre los distintos componentes del almidón, y que aun existan aquí series de fermentos para los sucesivos pasos de la acción hidrolizante, como las habrá quizá para los demás polisacáridos.

La diastasa se obtiene comúnmente de la levadura, y las opiniones de los investigadores que han tratado de obtenerla en el mayor estado de pureza posible respecto a sus propiedades físicas y químicas, son muy variadas, diciendo unos que apenas da las reacciones de los albuminoides y otros por el contrario que sí, etc.

En la mayoría de los fermentos estudiados hasta aquí, conocemos el estado activo, no el llamado zimógeno, es decir, el estado inactivo que necesita de substancias activadoras o de condiciones especiales para obrar. En la diastasa se conocen los dos estados y como activa-

dores se citan sales neutras, como, por ejemplo, ClNa o iones Cl. Su temperatura óptima es variable según su procedencia, así la diastasa procedente de la saliva tiene su óptimo a 46°, la del jugo pancreático a 36°-40° y a 75° se vuelve inactiva. Las mismas variaciones se encuentran en los óptimos de acidez o basicidad, acción de ácidos o sales, etc. Pero no se puede hablar de diastasas diferentes porque hallemos diferencias en estos detalles. Sabemos que el estado del fermento, según los jugos puede variar, que en un caso puede estar libre, en otro más o menos unido a substancias que hagan de «protege coloides», etc. Siendo muy interesante en cada caso que se pudiese saber, de qué modo actúa la circunstancia que varía. Pero, por desgracia, en la mayoría de los casos debemos guiarnos sólo por hipótesis y presunciones.

Las diastasas están muy extendidas. Todas las células animales y vegetales deben encerrar fermentos de este grupo, ya que almidón o glicógeno encontramos en todas partes, y por tanto, debe existir el fermento capaz de sintetizarlos y de descomponerlos. En los animales hervívoros y omnívoros se halla en la saliva. Debe faltar en la de los carnívoros. No existe en el jugo gástrico de ninguno, encontrándose, en cambio, en los jugos pancreáticos e intestinal.

Celulasas y hemicelulasas. Son los fermentos adaptados a los polisacáridos correspondientes, que se hallan formando parte de las membranas de las células vegetales. Quizá sean varias especies de fermentos y no una sola. Los animales carecen, al parecer con pocas excepciones, de ellos, poseyéndolos muchos microorganismos y las plantas en general. En algunos moluscos se han encontrado ambos en el intestino medio, así como en la secreción del hígado del cangrejo de río.

Inulasa. Ataca la inulina y se encuentra en el reino vegetal, cabe preguntarse si existirá en el animal también.

Glucosidasas

Sabido es que, sobre todo en las plantas, son inumerables las combinaciones de los distintos azúcares con toda clase de compuestos que no son hidratos de carbono. Tales combinaciones son menos frecuentes en los animales y se denominan glucósidos; pues bien, las *glucosidasas* son los fermentos que separan o unen el azúcar y el otro componente ; y no se llaman glucosidasas los fermentos que atacando a los glucósidos separen o unan otras porciones.

El tipo hasta ahora de éstas era la *emulsina* procedente de las almendras amargas, que descompone la amigdalina. Hoy está demostrado que está formado por la mezcla, por lo menos, de tres fermentos, y se admite que la descomposición del citado glucósido se verifica en tres etapas sucesivas y por la acción de aquellos tres fermentos.

El primero denominado *amigdalasa*, que comienza el ataque de la amigdalina separando por una parte la glucosa, y por otra el d-glucósido de la benceno-metilcianhidrina. El segundo es la *prunasa*, que separa este último compuesto en glucosa y benceno-metilcianhidrina. Y el tercero la *oxynitrilasa*, que descompone el último en ácido cianhídrico y aldehido benzoico. Es notable que el líquido digestivo del «helix pomatia» descompone la amigdalina de un modo diferente, se forma primero ácido cianhídrico, aldehido benzoico y amigdalosa, y luego este disacárido se descompone en dos moléculas de glucosa. Estos glucósidos se consideran sobre todo en las plantas, en gran parte, como substancias de reserva, y encierran muchos de ellos ácido cianhídrico que, como se sabe, es considerado como el primer paso de la asimilación del nitrógeno, a partir, probablemente, de los nitratos y del CO_2. Por eso interesan las glucosidasas. La emulsina se prepara ordinariamente de las almendras amargas, sin que hasta ahora se hayan conseguido aislar del todo los fermentos de la mezcla citada. Sin embargo, calentando durante diez horas la emulsina de 60° a 65°, se ha conseguido destruir todos sus fermentos constituyéndose menos la oxynitrilasa. Las hojas de las especies del género *Prunus* poseen sólo prunasa y no amigdalasa. En los vertebrados parece ser que faltan los fermentos del grupo de la emulsina. Los cangrejos, en cambio, y otros invertebrados disponen de ella.

Mirosinasa. Descompone el glucósido sinigrina y se halla en las semillas de la mostaza negra.

Vemos una vez más, por todos estos ejemplos, que el problema de la especificidad de los fermentos se resuelve hoy biológicamente, es decir, por su función. Si tenemos dos fermentos que actuando sobre el mismo o parecido substracto, originan diferentes descomposiciones ; o si un determinado fermento falta en una célula y por su ausencia la descomposición de una substancia dada se verifica de modo diferente al que se produciría de existir aquél, tendremos en ambos casos una base para suponer la existencia de dos fermentos diferentes.

Acabamos estas líneas con la indicación del grupo de las glucosidasas tan importantes de los vegetales y animales, que separan o unen los azúcares y las bases púricas que, junto con el ácido fosfórico, forman compuestos integrantes del núcleo celular. Los ácidos nucleínicos que tienen sólo una base púrica o pyrimídica se denominan mononucleótidos y los que tienen varias polinucleótidos. Estos están constituídos por varios, generalmente cuatro, mononucleótidos; son, pues, en su mayoría (no todos), tetranucleótidos. El ataque de los ácidos *nucleínicos* empieza con la separación de éstos. El *nucleótido* separado queda así constituído ácido fosfórico + nucleósido. Y el *nucleósido* está formado a su vez por base púrica + hidrato de carbono. Parece ser que funcionan aquí tres fermentos. El primero, la *nucleinacidasa*, transforma los ácidos nucleínicos en nucleótidos ;

segundo, la *nucleotidasa*, que descompone éstos en ácido fosfórico y nucleósidos, y tercero, la *nucleosidasa*, que descompone los últimos en sus dos componentes base púrica e hidratos de carbono. Se conocen varias nucleosidasas según sea la base púrica, así citaremos la guanil, o adenil, o hipoxantil, o xanthosil, unidos a un hidrato de carbono. Quizá haya un fermento diferente para cada uno de los cuatro nucleósidos citados. Con esto dejamos las carbohidrasas y pasamos a las

Esterasas y lipasas o hidrolasas actuando sobre grasas y grasas fosforadas

Son fermentos que sintetizan o descomponen las grasas con eliminación o absorción de agua. Las grasas, como se sabe, son ésteres de los ácidos grasos y los alcoholes. Las grasas neutras ordinarias son combinaciones de ácidos grasos con el alcohol trivalente, la glicerina. Se conocen con el nombre de lipasas las esterasas adaptadas a este caso particular de constitución de las grasas. Reservándose el nombre de esterasas a los fermentos que actúan sobre ésteres, cuyo alcohol es monovalente, por ejemplo, el alcohol etílico. Las opiniones sobre la especificidad de las lipasas y sobre si éstas y las esterasas son fermentos diferentes, son muy variadas. Siempre el no trabajar con productos puros nos impide contestar categóricamente a estas cuestiones, aun cuando se puede decir que para las grasas en general no se admite una especialización fermentativa. Los fermentos sintetizadores o hidrolizadores de grasas son muy abundantes en animales y en plantas. En aquéllos se encuentran lipasa en los jugos intestinal, pancreático y gástrico, así como en diferentes órganos y en la sangre. Se obtiene por maceración de los órganos que la contienen, por ejemplo, del hígado, y por extracción posterior mediante glicerina. Tiene su óptimo a 40°. Sabido es que la lipasa segregada por el páncreas y por las glandulitas de la mucosa intestinal que segregan el jugo de su nombre es inactiva y que los ácidos biliares son sus activadores naturales. La acción de la lipasa pancreática depende en absoluto del estado del sistema coloidal en que está incluída. Por eso, la activación de este lipasa-zimógeno segregado por el páncreas, parece ser que no consiste en una transformación de este supuesto estadio, sino que sencillamente el activador crea condiciones que conducen a la formación de un sistema coloidal que posee propiedades a propósito para favorecer la adsorción de substracto y fermento. Así, dijimos ya que Willstätter consiguió activar la lipasa pancreática mediante cierta cantidad de albúmina y de Cl_2Ca tan enérgicamente como lo hace la bilis.

Se discute sobre si es la lipasa la que actúa sobre los fosfátidos y en especial sobre la lecitina, o si existe para ésta un fermento particular. Nos referimos ahora a la síntesis o separación del éster propiamente dicho, pues el fermento que separa el ácido fosfórico de estas

grasas se denomina *fosfatasa*. La nucleotidasa antes citada sería una fosfatasa que separa ácido fosfórico de los nucleótidos. Es importante también la *hexosafosfatasa*, que separa o une el ácido fosfórico con azúcares y existe en jugos de órganos de animales, de sacaromices, etc. Fosfatasas son también los fermentos que separan el ácido fosfórico de las fosfoproteínas, como la caseina. La *fitasa*, por último, separa la inosita y el ácido fosfórico, que juntos forman la *fitina* existente en las plantas. Suele obtenerse la fitasa de la cebada. Las fitolipasas, es decir, las lipasas de las plantas, por ejemplo, las existentes en abundancia en semillas oleaginosas, como ricino, etc., obran más enérgicamente que las zoolipasas sobre las grasas neutras y menos sobre otros ésteres. Acabaremos con la mención de algunos fermentos semejantes; como lipoidasa se puede obtener de los leucocitos de la sangre de hombres, perros, gatos, o del pus de hombres. En reacción alcalina y tras largo tiempo, se consigue que descomponga la lecitina, separando la colina. Se diferencia de la lipasa obtenida de los leucocitos por su mucha termolabilidad.

Tanasa. Existente en el aspergillus, se ha utilizado para la aclaración de la constitución de los taninos.

Clorofilasa. De acción sobre la clorofila.

Sulfatasa. Fermento descubierto por Neuberg que separa las uniones que en la forma de ésteres, forman el ácido sulfúrico con los fenoles y con los cresoles. Estos ésteres de nuestra economía serían descompuestos naturalmente en ella por la sulfatasa. Su obtención, así como la de la fosfatasa, la consiguió Neuberg tomando como origen el hongo aspergillus oryzae. Siguió investigando en este material y halló que la takadiastasa extraída de él era un verdadero arsenal de fermentos, pues allí se encontraba celulasa, inulasa, lactasa, B-glucosidasa, amigdalasa, lab y un fermento peptolítico.

Hidrolasa actuando sobre albuminoides y sus productos de descomposición

Suelen hacerse dos grandes grupos, el de las *proteasas* y el de las *peptasas*. Las primeras descomponen o sintetizan los albuminoides, las segundas las peptonas. Sabido es que éstas son productos que aparecen en la descomposición de aquéllos. Empiezan, pues, las proteasas a actuar y al formarse las peptonas, continuarán las peptasas y viceversa si el proceso fuese sintético.

a) Proteasas

Hablaremos entre éstas de la pepsina, del lab y de la tripsina. Los dos primeros que trabajan en reacción ácida y en diferentes grados de concentración de iones H, los del grupo de la tripsina necesitan

reacción débilmente alcalina. Atacan los dos primeros a los albuminoides en sitios diferentes a la tripsina. Aquéllos no separan de la molécula albuminoidea ningún amino-ácido, ni hidrolizan ninguno de los polipéptidos sintetizados hasta hoy. La tripsina, en cambio, separa muy pronto amino-ácidos y éstos aparecen en los líquidos digestivos en distintos momentos.

Generalidades sobre proteasas. La primera cuestión que se presenta aquí, como pasaba al hablar de las polisacarasas, es el saber si estas proteasas son cada una de ellas un solo fermento o mejor un grupo de fermentos. Las siguientes consideraciones nos inclinan a suponer que la segunda hipótesis es cierta. La tripsina del jugo pancreático no es capaz de descomponer todos los polipéptidos sintéticos en sus amino-ácidos, y algunos de estos polipéptidos inatacables por la tripsina, lo son por la llamada erepsina del jugo intestinal. Esta, pues, debe ser ya un fermento diferente. Las proteasas y peptasas de las células del hígado, atacan los albuminoides de estas mismas células y a las peptonas procedentes de aquéllos y no atacan a los albuminoides y peptonas procedentes de células de otros órganos.

Dijimos que las proteínas de las diferentes células, son distintas, según los órganos. Sin embargo, las células construyen sus albuminoides con los mismos materiales, es decir, con amino-ácidos procedentes de la digestión; ahora bien, cada clase de células agrupa y coloca estas sencillas piedras de construcción de diferente manera con lo cual se producen proteínas específicas para cada órgano. Pero ¿quién es el responsable de esta agrupación específica de los amino-ácidos? Indudablemente los fermentos que los sintetizan y que luego los pueden descomponer y que deben ser a su vez específicos, por lo tanto.

Los fermentos defensivos del plasma sanguíneo denominados, según su descubridor, de ABDERHALDEN, sabemos que se adaptan a células de determinada especie y no a otras. Constituyen, por consiguiente, una prueba más de que no hay sólo una especie de triptasas y peptasas, sino varias. Quizá cada paso en la descomposición de los albuminoides requiera su fermento.

La tripsina, la pepsina y el mismo lab, que, según HAMMARSTEN, posee propiedades proteolíticas además de su particular función de contribuir a la transformación del caseinógeno en caseína, serán, como se ve, probablemente mezcla de numerosos fermentos.

Se comprende que las proteasas y peptasas estén muy extendidas en el organismo, ya que todas las células poseen albuminoides y, por lo tanto, su fermento correspondiente; los cuales deben pertenecer al grupo de la tripsina ya que actúan en medio alcalino o neutro, pero en ningún caso trabajan con la concentración de iones H que constituye el óptimo para la pepsina. Solamente el bazo parece encerrar un fermento parecido a la pepsina. Es curioso que muchos albuminoides genuinos como los del plasma resisten a las triptasas, pero

pierden esta resistencia después de coagulados. Probablemente juegan aquí un papel las propiedades físicas de la substancia. (Véase en coagulación de albuminoides, sus cambios físicos y quizás químicos.)

En el latex y fruto de la «carica papaya» existe un enérgico fermento proteolítico denominado *papayotina*, que merece ser citado aquí por la notable propiedad de ser estimulado en su acción por la influencia del ácido cianhídrico y del sulfhídrico. Ambos ácidos son, en general, paralizantes de los fermentos (venenos). Su temperatura óptima se desvía bastante de lo ordinario por lo elevada, pues está entre 80°-90°.

Autolisis, histolisis. Con gran interés se han estudiado las proteasas y peptasas celulares. Se ha hablado de endo y ectoproteasa y de endo y ectopeptasas, según que no sean expelidas al exterior de las células o que lo sean. Ya hemos dicho que todas las células poseen tales fermentos que deben ser específicos. Estos fermentos tienen mucho interés, pues explican el que las células y órganos muertos o separados del organismo, muestren pruebas evidentes de que en ellos se verifican fenómenos de descomposición, con exclusión absoluta de toda flora microbiana, a la que se hacía antes responsable de semejantes destrucciones. Se han comparado los productos resultantes de la descomposición de órganos infeccionados intencionalmente, con los obtenidos de la descomposición de órganos que a fuerza de extremos cuidados se han conservado largo tiempo perfectamente asépticos. Y se ha visto que los microorganismos descomponen en seguida los productos originados por un primer ataque, es decir, que realizan pronto desintegraciones más completas que las observadas en órganos estériles. Los productos de descomposición hallados en éstos son siempre bastante complicados, aunque en pequeña cantidad se presente alguno más sencillo denunciador de una acción llevada más lejos. Este fenómeno de autodescomposición se llama *autolisis*. No es preciso que la célula u órgano estén separados del organismo o muertos ya para autolizarse, basta que la regulación de los cambios nutritivos normales cese por cualquier motivo. Conocemos procesos fisiológicos y patológicos abundantes de *histolisis*, por ejemplo, los salmones durante su permanencia en el agua dulce sufren una histolisis de los músculos dorsales para nutrir con sus productos las glándulas sexuales. La regresión del útero de las embarazadas después del parto, es otro ejemplo de histolisis fisiológica; así como la desaparición de tantos órganos que tiene lugar en las metamorfosis de varias especies animales. En cambio, la liquefacción de las masas de fibrina de los bronquiolos y bronquios de las neumonías para su reabsorción, representa el final por autolisis de un proceso patológico. En este caso son los leucocitos que emigran en la masa de fibrina los que producen los fermentos necesarios para su digestión. En el ejemplo de la regresión del útero de las embarazadas y de la de los músculos del dorso de los salmones deben intervenir también leucocitos, pero actúan con-

juntamente fermentos de sus propias células. Autolisis en realidad debería llamarse al proceso de descomposición del contenido de células muertas por fermentos suyos. La diferencia entre las descomposiciones de las células muertas y las que se verifican en los procesos en vida, que serían las verdaderas histolisis, es que en el primer caso, la descomposición no está regulada y son atacados igualmente las grasas, fosfátidas, nucleoproteidos, ácidos nucleínicos, etc., junto con los albuminoides verdaderos, sin distinción química ni histológica ninguna. En la histolisis en vivo, la descomposición es regulada, llega sólo a cierto límite, y se limita a tal o cual compuesto o parte de la célula o del tejido. En las plantas existen, como se sabe, muchos procesos de histolisis especialmente activos cuando la semilla germina. Y es indudable que la autolisis de los tejidos de las plantas juegan un cierto papel en nuestra digestión, pues cuando comemos plantas no cocidas tomamos con las células sus fermentos y es probable que estos agentes que quedan libres después que ellos han autolizado las células, si las condiciones son adecuadas, contribuirán a la descomposición de otras substancias. Debe poseer el organismo vivo admirables medios de regulación fermentativa. Por estos medios se consigue que fermentos y sus substractos que se hallan juntos en vida no se ataquen, quizá sea que aquéllos están inactivados, y en caso de que el ataque comenzase sólo llega hasta cierto punto. Sólo la muerte trae una descomposición desenfrenada de todas las partes de la célula. La acumulación de los productos de descomposición en la célula muerta, ya que la sangre y la linfa no pueden, como en vivo, desembarazarla de ellos, crea para las fermentaciones condiciones del todo diferentes a las existentes en vida, lo mismo que la falta de oxígeno y la acumulación de CO_2 produce la detención de los procesos fermentativos normales de oxidación y de reducción. Por estas razones, hay que ser muy prudente al pretender generalizar los datos adquiridos, estudiando la autolisis, a los procesos realizados en vivo.

Pepsina. Como hemos dicho, los fermentos del grupo de la tripsina se encuentran tanto en las células como en jugos segregados. En cambio, los del grupo de la pepsina sólo se han encontrado con seguridad en productos segregados y especialmente en el jugo gástrico. Su acción, como se sabe, tiene lugar en las glándulas del estómago por las células correspondientes bajo la forma de un zimógeno y su activación se verifica normalmente por medio del ClH. Este contribuye, además, notablemente a la creación de un estado físico favorable de los albuminoides, para ser atacados por la pepsina, favorece su hinchamiento por imbibición *(quellung)*. También las glándulas de Brunner forman pepsina (Abderhalden y Rona). La pepsina de los animales de sangre fría presenta un óptimo de concentración de iones H superior a los de sangre caliente, quizá no sean del todo idénticos. En la secreción de las plantas carnívoras no es seguro que se halle pepsina.

Lab. El lab o chimosina es segregado por las glándulas de la mucosa estomacal también en forma de zimógeno y su activador es el ClH. Provoca, como se sabe, la coagulación de la leche y el proceso debe ser el siguiente : El lab transforma el caseinógeno de la leche en caseína, y ésta se une a sales solubles de calcio y se precipita. Privando la leche de sales de calcio solubles, mediante el ácido oxálico, no hay precipitación, y basta añadir Cl_2Ca para que aparezca ésta. Que el caseinógeno debe sufrir una transformación, lo prueba el hecho de que él en presencia de sales de calcio no precipita y sólo por acción del lab se transforma en caseína y precipita. Algunos autores han negado la existencia del lab y afirmado que pepsina y lab eran la misma cosa. Hammarsten, con experiencias concluyentes, ha demostrado lo erróneo de tal afirmación. Ivar Bang ha aislado un fermento lab en la especie humana y en los cerdos, bastante diferente al procedente de las terneras, y le llama parachimocina. El papel fisiológico del lab debe ser éste : la leche es el único alimento de los mamíferos en sus primeros tiempos, y es sabido que los alimentos líquidos pasan con gran rapidez al duodeno ; para evitar tal rapidez y someter a la leche a la acción de la pepsina durante más tiempo, viene la floculación de la caseína que arrastra las grasas, etc., o sea la coagulación de la leche por la acción del lab. Terminaremos diciendo que su influencia se verifica con una concentración de iones H, inferior al de la pepsina, y que debe tener una acción hidrolítica además de la de precipitación de la caseína, aunque Inickoff la niegue.

Tripsina. Segregada por el páncreas como zimógeno, éste es activado, como se sabe, desde los trabajos de Bayliss y Starling, por la enterokinasa contenida en el jugo intestinal. Tal activación no puede consistir en una unión de ambos, pues se han podido activar muy diferentes cantidades de jugo pancreático, con pequeñísimas de solución de enterokinasa, es decir, no hay proporción ninguna en la unión. Sales de calcio pueden también activar el tripsinógeno y se supone que la misma tripsina activa el tripsinógeno, esto sería un caso de autocatálisis. Aunque aquí la tripsina activa debe actuar sólo creando condiciones favorables. El tripsinógeno se conserva bien a la temperatura ordinaria en una solución 0,16 normal de sosa, en cambio, la tripsina pierde pronto al guardarla en su actividad.

Pepsina y tripsina atacan la molécula albuminoidea en diferentes sitios, sin poder especificar hoy exactamente el lugar del desdoblamiento o de la unión si se trata de una síntesis. La primera comienza rompiendo las grandes moléculas albuminoideas y forma muchísimas pequeñas. Esto prepara el trabajo para la tripsina del intestino, pues aumenta como es lógico la superficie de ataque del nuevo fermento. Así se ve que la descomposición de los albuminoides en el tubo de ensayo por el jugo pancreático, va más despacio que si se hace después de haber actuado allí la pepsina, y en el organismo la diferencia debe ser mayor, pues el intestino se encarga, mediante su absorción, de

desembarazar la mezcla de los productos de descomposición que se amontonan en el tubo de ensayo y frenan la labor fermentativa.

Erepsina. El estudio de la descomposición de los polipéptidos obtenidos sintéticamente, ha demostrado que la tripsina del jugo pancreático no puede descomponer a todos ellos en sus amino-ácidos. Una parte de los polipéptidos no atacables por la tripsina lo es por la llamada erepsina del jugo intestinal. Por eso, ésta requiere una individualidad propia. No se sabe si se trata de uno solo o de mezcla de varios fermentos. Se ha intentado con ella sintetizar polipéptidos a partir de amino-ácidos, y se ha logrado (añadiendo reguladores de iones H a la mezcla, antes no) apreciar variaciones en su poder rotatorio, lo cual parece indicar que hubo allí alguna variación, probablemente síntesis, pero no habiéndose podido aislar el producto, no hay nada seguro.

b) Peptasas

Después viene la descomposición de las peptonas y polipéptidos, para llegar a los amino-ácidos, última etapa de la descomposición albuminoidea. Los agentes que originan estos cambios son las peptasas y polipeptidasas que seguramente son fermentos diferentes al grupo de la tripsina. En el estómago no deben existir, pues lo más que llega allí es la digestión hasta formar peptonas, más o menos simples, pero sin llegar a los amino-ácidos. En el intestino se encuentran, en seguida del paso del quimo allí, juntos peptonas de diferente complicación y amino-ácidos diversos. Trabajan allí fermentos del grupo de la tripsina y también peptasas y polipeptidasas. Antes se creía que por ser las peptonas ya dializables, éstas debían ser adsorbidas por las vellosidades intestinales, hoy que sabemos que existen en el jugo intestinal muchos amino-ácidos, se cree que es en esta forma que se verifica sobre todo la absorción en el intestino de los productos albuminoideos transformados. La acción de estos fermentos consiste indudablemente en la hidrólisis de las cadenas de amino-ácidos que forman las moléculas de los albuminoideos o de sus productos de descomposición, y esta hidrólisis origina una ruptura, precisamente en la unión ácido-amínica, como se ve en el ejemplo siguiente :

$$CH_3\cdot\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH + H_2O = CH_3\cdot\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH_2}}\cdot COOH + \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH_2}} - COOH$$

Alanilglicina + agua = Alanina + glicina ó glicocola

Si se tratase de síntesis por el mismo fermento el proceso sería el inverso. Así, la ingestión del ácido benzoico determina la secreción del hipúrico, el cual es el resultado sintético de la unión de aquél con la glicocola en nuestro cuerpo. Del mismo modo se verifica la síntesis de ambos haciéndolos circular artificialmente por el riñón, después de haberlos disuelto en sangre desfibrinada.

$$C_6H_5\cdot COOH + NH_2\cdot CH_2\cdot COOH = C_6H_5\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH + H_2O$$

ácido benzoico + Glicocola = ácido hipúrico + agua.

El fermento para realizar esta síntesis o viceversa, existe en todos los órganos. También en las plantas se han encontrado fermentos capaces de verificar estas reacciones.

Arginasa. De acción parecida a la de los anteriores, esta enzima descompone la arginina en urea y ornitina. Se suele obtener del hígado de perro o del de ternero. La arginasa hállase en todos los órganos menos en el páncreas y en la sangre. En las aves y reptiles se ha echado de menos en el hígado.

Desaminasas. Continúan la disgregación de los albuminoides, separando de los amino-ácidos y de las bases púricas su grupo amínico. Pero esta reacción debe ser algo complicada, pues no se ha podido aislar de órganos un fermento que en el tubo de ensayo separe un grupo amínico de un amino-ácido. Quizá para cada uno de éstos exista su fermento, ya que, por lo menos, para la desaminación de la adenina y de la guanina se ha demostrado la existencia de dos fermentos diferentes. Como se comprende, todas estas enzimas tienen gran interés en el metabolismo del hombre.

Ureasa. Se debe citar que la ureasa que desamina la urea, formando amoníaco y ácido carbónico

$$CO\begin{cases}NH_2\\NH_2\end{cases} + 2\,H_2O = CO_3H_2 + 2\,NH_3.$$

Se puede obtener de las bacterias, de frutos de la soya, etc., tiene gran importancia en el proceso del aprovechamiento del nitrógeno, órgano de las plantas (1). Tras de su acción viene la de los *fermentos nitroso* y *nítrico* que oxidan al amoníaco y lo convierte en estos ácidos, o mejor en sus sales, nitritos y nitratos. Todos ellos son segregados por microorganismos. La ureasa no se ha encontrado en ningún tejido animal. En cambio, existe en los hongos del gen. penicillum, aspergillum, en los de sombrerillo, y aun en las plantas superiores de las que se obtienen ureasas algo diferentes según la procedencia. También hay fermentos diferentes para la descomposición o síntesis de la creatina y de la creatinina.

Fermentos especiales sobre albuminoides

Fibrino-fermento. Nos referimos a los que hacen pasar a ciertos albuminoides del estado sol. al gel. y no sabemos si este cambio es lo primitivo, o si el fermento provoca primero un cambio químico y

(1) Para la asimilación del N atmosférico por acciones diastásicas, véanse los trabajos de Rocasolano en sus *Estudios Químico-Físicos sobre la materia viva*, pág. 325, 2.ª ed. Zaragoza, 1917.

luego la transformación de estado correspondiente. Ya hablamos del lab que coagula la leche, y ahora citaremos el fibrino-fermento que, según la creencia general, provoca la coagulación de la sangre. Se cree que existe en la sangre como inactivo y que necesita un activador, sea en forma de un cambio de estado del medio, o sea una substancia realmente. No se sabe si la transformación del fibrinógeno en fibrina consiste en una hidrolización o en otra transformación química diferente. Hay quien dice que el fibrino-fermento no existe y que las condiciones físicas son las que provocan la coagulación de la sangre. Tal cambio de condiciones aparecería al salir la sangre de los vasos.

Hasta ahora hemos hablado sólo de hidrolasas, es decir, de fermentos que tienen el carácter común de descomponer compuestos con absorción de agua, o que sintetizan los mismos desprendiendo ésta. Se necesitarán, por lo tanto, tres factores. Fermento, substracto y agua. Todas ellas, además, deben pertenecer al tipo de fermentaciones con reacciones intermedias. Es posible que la fijación del agua sea el hecho primitivo y luego venga la verdadera descomposición ; como en el caso de la síntesis, es probable que lo primero sea la unión y luego venga la separación del agua, aunque es posible que suceda lo contrario. Todo lo que sobre esto se diga son por ahora especulaciones cuya certeza o error sólo se conocerán el día en que sepamos la naturaleza, estructura y modo de obrar de los fermentos.

Consideraciones generales sobre relaciones recíprocas, estructura, etc., de las hidrolasas

La fermentación alcohólica se ha considerado desde el principio, como un efecto limitado a la acción de determinadas células, sacaromices, etc., y sin embargo, hoy se sabe que la descomposición de la glucosa y azúcares similares en el organismo pasa por fases que recuerdan en muchos detalles a aquélla, fases que se repiten a veces íntegramente en todas las células y sobre todo en los músculos. Así, por ejemplo, el hecho de la fermentación alcohólica que parece es la señal del comienzo de la descomposición del azúcar, es la formación de un éster del mismo con el ácido fosfórico, a saber, el éster difosfórico de la hexosa correspondiente, sea la fructosa u otro azúcar $C_6H_{10}O_4(H_2PO_4)_2$; pues bien, el lactacidógeno, obtenido prensando los músculos, es parecidísimo, si no idéntico, al citado éster. Siendo curioso el hecho de que la formación de este compuesto no es condición previa obligada de la fermentación ya que ésta puede verificarse sin la formación del éster cuyo papel se desconoce en absoluto.

Otro caso curioso de analogía de procesos está en la observación de que la fermentación de los albuminoides en los organismos desemboca al fin en la de los hidratos de carbono del modo siguiente : Neuberg ha demostrado que la levadura encierra un fermento que separa

CO_2 de los ácidos orgánicos que tienen en el carbono α (1) el grupo llamado acetónico o carbonilo, de tal modo que el primer ácido α acetónico o sea el pirúvico $CH_3 - CO - COOH$, pasa al aldehido acético $CH_3 - C\overset{O}{\underset{H}{<}} + CO_2$. El fermento que realiza tal reacción y, por lo tanto, que realizará también el proceso contrario, se llama *carboligasa* porque, como se ve, puede, cuando sintetiza, introducir un átomo más de C en la cadena orgánica. El aldehido formado, pasa a alcohol etílico por reducción $CH_3 \cdot C\overset{O}{\underset{H}{<}} + H_2 \rightarrow CH_3 \cdot CH_2OH$.

Vemos que los dos productos clásicos de la fermentación alcohólica, el CO_2 y el $CH_3 \cdot CH_2OH$, no se presentan al mismo tiempo como productos finales de la fermentación del azúcar. Añadamos que este ácido con su grupo acetónico $CH_3 - CO - COOH$ es verosímilmente un producto de la descomposición de los hidratos de carbono. Pues bien; los albuminoides que al fin se descomponen, como sabemos, en sus aminoácidos, pasan luego por la fase de *desaminación* (pérdida del grupo amínico merced a la desaminasa) y se convierten en un ácido α acetónico, el cual, como acabamos de decir, mediante la carboligasa, continúa el proceso, como los ácidos semejantes procedentes de hidratos de carbono ; es decir, da origen al correspondiente aldehido con un átomo de C menos y luego por oxidación o reducción al ácido o al alcohol correspondiente, así :

$$HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} \cdot COOH + O \rightarrow NH_3\, HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH - CO_2 \rightarrow$$

El amino-ácido llamado *acidoglutamínico* pasa a *ácido α acetonicoglutárico*

$$HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot C\overset{O}{\underset{H}{<}} + O \rightarrow HOOC \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$$

pasa al *aldehido correspondiente* que pasa al *ácido succínico.*

Añadamos que el cofermento necesario para la fermentación alcohólica y para la de los hidratos de carbono en el organismo son ambos resistentes a la cocción, y que el jugo obtenido mediante la ebullición en agua de la levadura y de los músculos pueden sustituirse, recíprocamente, en su función de cofermentos. Es muy posible que ambos cofermentos sean, por lo tanto, iguales.

De todas estas consideraciones se deduce que la serie de cambios que se producen en la descomposición de los azúcares en el organismo, y lo mismo la llamada fermentación alcohólica, no son el producto de la actividad de un sólo fermento producido por la levadura, denomi-

(1) Carbono α es el que ocupa en la cadena el lugar inmediato al grupo ácido COOH, por ejemplo :

$$CH_3 - \underset{\gamma}{CH_2} - \underset{\beta}{CH_2} - \underset{\alpha}{CH_2} - COOH.$$

nado *zimasa*, sino que ésta representa una mezcla de fermentos que realizan sucesivamente una serie de cambios químicos. Un problema a resolver sería el de la separación de los diferentes fermentos que componen la zimasa, y por lo que toca a la carboligasa se ha demostrado que es mucho más resistente que los demás.

Las células de la levadura segregan un jugo que, como sabemos, es muy rico en fermentos, pues además de éstos que producen la fermentación alcohólica, encierra indudablemente otros, ya que este jugo es capaz de descomponer grasas, albuminoides y sus derivados los polipéptidos, nucleoproteidos, etc.

Dependencia de la acción de la zimasa con la conservación de la estructura protoplasmática. — Sabido es que BUCHNER realizó el experimento (que se repite muy a menudo, pues ha quedado como uno de los procedimientos para extraer fermentos de la levadura) de destruir toda estructura celular de los sacaromices, frotándolos enérgicamente entre granos de arena, y sometiendo esta masa a presiones grandes. El jugo así obtenido poseía facultades germinativas, y por lo tanto, tal experiencia se juzgó concluyente y con ella se acabó la discusión entre los que opinaban que para la fermentación alcohólica era indispensable la presencia de elementos figurados, y los que decían que bastaban sus jugos a favor de estos últimos. Pues bien; ABDERHALDEN y FODOR han demostrado, en 1921, que este jugo, lo mismo que el obtenido por maceración, no conservaban mucho tiempo su facultad fermentativa en lo que respecta a la zimasa, a no ser que encierre células de levadura, y que es necesaria la existencia de trozos de células, con una determinada estructura, y sobre todo en un estado semejante al en que estaban en la célula origen, para que se manifieste la fermentación alcohólica. Concluyen con la afirmación categórica de que el complejo zimasa va unido seguramente al protoplasma, o representa él mismo una parte integrante de la célula. Sabemos que para la sacarasa ocurre lo contrario, ya que se ha podido aislar de muchísimas impurezas, siempre conservando su energía fermentativa. Ya en 1913 OTTO WARBURG, estudiando la relación entre estructura celular y actividad de la zimasa llegó a la conclusión que tanto más disminuía ésta cuanto más se destruía la célula. Sabiendo la importancia que hoy se concede a la extensión de la superficie de acción para los procesos fermentativos, y que cuanto más se conserva la estructura más superficie apta existe, se explica que la destrucción de la configuración estructural de la célula sea la causa de la disminución de la energía de la zimasa.

Síntesis orgánica importante. Consecuencia de la acción de la carboligasa. Hoy se concede una gran importancia biológica al hecho observado de que en la fermentación del ácido pirúvico $CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ (que, como sabemos, es un paso obligado a su vez de la alcohólica), por la acción de la levadura y de otros microorganismos, aparece el

compuesto alcohólico-acetónico, *acetilmetilcarbinol*, cuyo compuesto debe aparecer por unión de dos moléculas del aldehido derivado en la forma conocida y que reproducimos

$$\left.\begin{matrix} CH_3 \cdot CO \cdot COOH - CO_2 \\ CH_3 \cdot CO \cdot COOH - CO_2 \end{matrix}\right\} \rightarrow \left.\begin{matrix} CH_3 \cdot C(=O)H \\ CH_3 \cdot C(=O)H \end{matrix}\right\} \rightarrow CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot CH_3$$

2 mol. de ácido pirúvico → 2 mol. del aldehido → 1 mol. de acetilmetil-carbinol.

Si se demostrase, dice ABDERHALDEN, que este proceso sintético se verificaba en todas las células o en determinadas de los organismos superiores, de un golpe se había iluminado el proceso de síntesis de cadenas complicadas, con varios átomos de carbono por reunión de otras más sencillas, se formarían ácidos grasos elevados partiendo de productos de descomposición de la glucosa y quizá de amino-ácidos. Esto conduciría a buscar en las plantas, sobre todo, procesos de síntesis análogos. Pero, hoy por hoy, aunque se ha demostrado en las plantas superiores la formación del alcohol, se desconoce en detalle los diversos de la descomposición del azúcar en sus tejidos, y el modo cómo utilizan luego este alcohol formado.

Capítulo V

Fermentos oxidantes y reductores

Hasta ahora en los procesos fermentativos que hemos estudiado hemos encontrado siempre reacciones hidrolíticas, a excepción de la que se verificaba con intervención de la carboligasa y de la zimasa. Se trataba de síntesis con desprendimiento de agua o de descomposiciones con absorción de ella. Ahora vamos a tratar de procesos fermentativos referentes a oxidaciones y reducciones en el organismo, procesos que no son hoy todavía del todo conocidos, Bach y Chodat, con sus trabajos que datan de 1903 y 1904 (1), aclararon mucho exponiendo una hipótesis que es, con mucho, la más aceptable. Dicen que para las oxidaciones y reducciones, disponen los organismos de dos fermentos diferentes denominados en general peroxidasas y catalasas.

Peroxidasas y catalasas. Ambos necesitan además un *peróxido* para poder descomponerlo, desprendiendo oxígeno que es aprovechado en los procesos fermentativos de que nos vamos a ocupar. Según esto, así como en las hidrolasas, hablábamos de tres factores como mínimo a saber, *fermento*, *agua* y *substracto*, aquí encontraremos *fermento*, un *peróxido* y *substracto*. La peroxidasa y la catalasa descomponen el bióxido de hidrógeno H_2O_2 en $H_2O + O$, y esta reacción se utiliza en los laboratorios para delatarlos del siguiente modo: Nosotros podemos conocer la cantidad de H_2O_2 que hay en una solución, en ciertas condiciones mediante el permanganato potásico ; pues bien, si añadimos a esa solución unas gotas del jugo que sospechamos que encierra la peroxidasa o la catalasa, y en la certeza de que no hemos añadido substancia alguna que fuera de esos fermentos pueda provocar la descomposición del H_2O_2, notaremos al poco rato, volviendo a dosificar mediante el permanganato, que el H_2O_2 ha disminuído debido a su descomposición en $H_2O + O$, si efectivamente el jugo que agregamos contenía uno de los dos fermentos. La diferencia esencial entre peroxidasa y catalasa, es que la primera separa el oxígeno del peróxido en forma activa O, y en cambio, la catalasa lo separa en forma molecular O_2, que es relativamente inactivo. La catalasa necesita actuar, por lo tanto, sobre dos moléculas de peróxido al mismo tiempo, ya que de cada una sólo puede separar un átomo de O. Liebermann cree que este fermento se une primeramente con el H_2O_2, y luego viene la descomposición del último, quedando libre la catalasa, que puede otra vez actuar :

$$2\left[\text{catalasa} + H_2O_2\right] \rightarrow 2\left[\text{catalasa}\begin{matrix}O\cdot OH\\H\end{matrix}\right] \rightarrow$$

$$2\,(\text{catalasa}) + O_2 + 2H_2O.$$

Este fermento ha sido objeto de muchas investigaciones no sólo porque se encuentra en todos los tejidos animales y vegatales, sino por su gran semejanza con muchos materiales inorgánicos, especialmente el platino coloidal, que descomponen también el H_2O_2.

Hemos dicho que el oxígeno molecular O_2 es incapaz de reaccionar con substancias como glucosa, ácido láctico, etc., existentes en el organismo y que son oxidadas en los procesos vitales, por lo cual ha surgido la pregunta : *¿Para qué servirá la catalasa*? Téngase en cuenta que es un fermento extendidísimo en los seres vivos, y que existe en toda célula en que se verifiquen procesos oxidantes y reductores. Hoy se acepta que quizá en las oxidaciones y reducciones vitales se forme como producto accesorio o intermediario el H_2O_2, que por ser un veneno para el protoplasma, necesita ser descompuesto por la catalasa, apenas formado, también se ha dicho que descompondría peróxidos que se hallasen en exceso y se ha pensado que quizá sea este fermento el que produce la separación del O de la oxihemoglobina. Por último, se ha supuesto que quizá las células almacenen oxígeno en forma de peróxidos unidos a los nucleoproteidos, y que la catalasa sea capaz de dejar este oxígeno en libertad cuando las células lo necesitasen.

Peroxidasa. Para los procesos oxidantes y reductores orgánicos tiene, pues, una importancia mayor la peroxidasa en compañía, como se sabe, de un peróxido, pues sólo la unión de peróxido + peroxidasa es activa. Este sistema representa lo que muy a menudo se llama una *oxidasa*. Además, para que el proceso sea continuo es preciso que el peróxido absorba en seguida el oxígeno perdido en el proceso oxidante ; por esto se explica que la oxidación de la tintura de guayaco por las patatas sólo tiene lugar en presencia de oxígeno.

Como dijimos para la catalasa puede ser substituída la acción de la peroxidasa por muchas substancias inorgánicas y recíprocamente. Así, en una mezcla de ácido láctico y H_2O_2 la oxidación del primero tiene lugar con extrema lentitud, pero basta la presencia de pequeñas cantidades de SO_4Fe, para acelerar enormemente la reacción, y si en vez de sal de hierro, añadimos peroxidasa, obtenida, por ejemplo, de la raíz del berro, observaremos la misma aceleración en

(1) En varias comunicaciones en los *Berichte d. deutsch. Chem. Ges.* Reunidos en los *Archiv d. Sciences. Phys. et nat.* 1914, Ginebra *Recherches sur les ferments oxydants.*

la reacción. Puede, por lo tanto, sustituir la peroxidasa al SO_4Fe. Se sabe, además, que la adición de manganeso y de hierro a diferentes oxidasas produce gran efecto y que las cenizas de éstas contienen siempre uno de aquellos dos metales, no es, por lo tanto, extraño que haya nacido de estos hechos la hipótesis de que estos fermentos tendrían en las oxidaciones orgánicas el papel de transformar el Fe y el Mn en un estado especial de extraordinaria actividad, para que ejerciesen el papel de activos catalizadores de la reacción.

La mayor dificultad con que se tropieza, al tratar de aplicar esta teoría de BACH y CHODAT en ciertos casos, es la gran especialización que demuestran muchas oxidasas. Así, BERTRAND demostró que la *lacasa* actúa sobre la hidroquinona o el pirogalol muy fácilmente y no tiene acción sobre la resorcina y la floroglicina. Tampoco actúa sobre la tirosina que es oxidada sólo por un fermento especial, la tirosinasa. Tales hechos no pueden ser explicados por esta teoría. Debíamos esperar que el oxígeno activo, puesto en libertad por la peroxidasa fuese apto para realizar oxidaciones sin distingos. Ahora bien; de la experiencia antes citada referente a la oxidación del ácido láctico mezclado con H_2O_2, cuya aceleración era indiferentemente producida por la presencia de sales de Mn o de Fe o de peroxidasa, parece deducirse que la especificidad *radica en el peróxido del sistema oxidasa.* Quizá sea necesaria cierta afinidad entre el peróxido y el substracto para combinarse, y hacer posible (sensibilizado ya éste mediante la combinación) la unión del oxígeno libertado por la peroxidasa con el substracto. Para explicar esta reacción de sensibilización cita BAYLISS (1) las llamadas reacciones combinadas de OSTWALD « Gekoppelte Reaktionen », un ejemplo de las cuales es el siguiente : Si agitamos una disolución de arsenito sódico en el aire no se verifica ninguna oxidación, si en vez de esta sal agitamos una de sulfito sódico, la oxidación tiene lugar con gran rapidez. Mezclamos ahora las dos soluciones y las agitamos en el aire, y entonces se oxidan tanto el arsenito como el sulfito sódicos. Indudablemente ha habido aquí una activación del oxígeno por algún medio. OSTWALD llama al sulfito sódico que debe ser el que ha activado la reacción del arsenito con el oxígeno, el *inductor* « induktor » ; al arsenito, que ha recibido la influencia anterior, le dice el *receptor* «Akzeptor » ; y al oxígeno, que es común a ambas reacciones *agente* « Aktor ». Llama primaria a la reacción del sulfito con el O y secundaria a la otra. En la acción catalítica que el SO_4Fe ejerce sobre la oxidación del IH por el H_2O_2, la reacción del $SO_4Fe + H_2O_2$, sería la primaria ; la del $IH + H_2O_2$ la secundaria, el SO_4Fe sería el *inductor*, el IH el *receptor* y el H_2O_2 el *agente.* Quizá pueda aplicarse todo esto a las oxidaciones orgánicas en general y al caso de la oxidación del ácido láctico por el H_2O_2 en presencia del SO_4Fe o de peroxidasas en particular.

En oposición a esta representación, según la cual en toda oxidación orgánica es el oxígeno el que es trasladado a la substancia que

(1) *Das Wesen der Enzym-Wirkung*, pág. 93.

se va a oxidar, sea cualquiera el modo o forma en que esto se verifica, expuso WIELAND, desde 1912, *la teoría de la deshidrogenación*, que lleva su nombre. Partía de la observación de que el platino o el paladio finamente divididos pueden, a la temperatura ordinaria, robar H de muchas combinaciones. Es decir, que si se coloca paladio en condiciones adecuadas con compuestos « oxidables » se observa desprendimiento de hidrógeno. El compuesto « oxidable », en consecuencia, se hace más rico en oxígeno sin que realmente haya entrado en él un átomo del mismo, pues es evidente que su tanto por ciento, respecto al peso molecular del cuerpo, habrá aumentado después de la pérdida en hidrógeno de éste. Aquí no tiene que haber activación alguna del oxígeno, más bien habría que hablar de activación del hidrógeno. El paladio pierde en acción a medida que absorbe H, pero si por medio del azul de metileno, etc., le desembarazamos de él vuelve a recobrar su actividad. El paladio es, por decirlo así, a su vez reactivado por la substancia ávida del hidrógeno.

Como vemos, aceptada esta teoría de WIELAND, tenemos que admitir para que se realice el proceso íntegro, la presencia de una substancia *activadora* del hidrógeno (el paladio, en el ejemplo anterior); debe haber otra que recoja el H activado, pues sino el proceso se detiene; debe haber, pues, un *receptor* del H (azul de metileno, etc.), siendo evidente que esta substancia, al enriquecerse en H, pierde proporcionalmente en O, es decir, se *reduce*. Por eso se puede decir que unido al fenómeno de oxidación debe haber otro paralelo de reducción en la célula. Es muy probable que un receptor de H sea el mismo O, y que se forme al unirse ambos H_2O_2, el cual por medio de la catalasa se descompondrá en $H_2O + O$, y con esto queda el O otra vez dispuesto a actuar de receptor de H. Podría suceder también que el mismo H_2O_2 pudiera ser receptor de H y descomponerse luego en dos moléculas de H_2O.

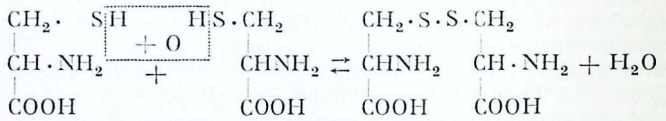
Para investigar estos procesos de oxidación y de reducción en las células, se utilizan con éxito receptores de H que poseen la cualidad de poseer distinto color en las fases oxidadas y reducidas, propiedad que permite seguir fácilmente estos cambios. Se ha utilizado el azul de metileno, el m-dinitrobenzol, etc.

Se cree que las substancias activadoras del H, que hacen el papel del paladio de nuestro ejemplo, deben ser fermentos denominados.

Deshidrogenasas o deshidrasas. Se necesitarían, por lo tanto, tres substancias para la realización íntegra del proceso ; 1.°, la substancia orgánica que va a oxidarse, que por dar el H se ha llamado *donator* ; 2.°, el fermento que roba este H poniéndolo en libertad, es decir, activándolo, sería el activador o *fermento deshidrasa*; 3.°, la substancia que recoja el H activado, es el *receptor* ; y 4.°, por último, si el receptor fuese el O y se formase H_2O_2 haría falta la catalasa, para descomponer este último cuerpo.

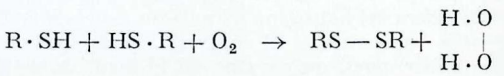
La naturaleza de las deshidrasas es hoy desconocida, sólo se sabe que actúan específicamente.

En el organismo existen bastantes compuestos capaces de realizar una deshidrogenación como la descrita, por ejemplo, la *cisteína* que se encuentra muy a menudo en las células caracterizadas por una gran actividad química; y esta cisteína oxidándose pasa a cistina y recíprocamente



dos cisteínas + oxígeno — cistina + agua

Pero, como se ve por las fórmulas, a la cistina le faltan dos H para originar dos moléculas de cisteína. Puede ser, por lo tanto, un buen receptor de H. En la deshidrogenación puede formarse también un peróxido



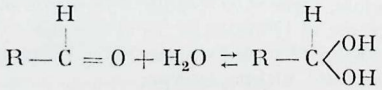
dos cisteínas más oxígeno — cistina más peróxido

Como se ve, en estas oxidaciones por deshidrogenación no interviene el oxígeno en la reacción conforme a la concepción antigua, es decir, incorporándose a la molécula que se oxida, sino como receptor de H. En seguida surgió la pregunta si no se podría experimentalmente sustituir el O por otro receptor de H, es decir, si se podrían realizar *oxidaciones sin oxígeno*, y el ejemplo más atrayente de tal clase ha sido la oxidación del alcohol etílico y su transformación en ácido acético sin oxígeno: Se sabe que el alcohol etílico bajo la influencia de microorganismos se oxida y se transforma en ácido acético $CH_3CH_2OH + O \rightarrow CH_3COOH + H_2O$. Cuando se demostró que se formaba como producto intermediario el etanal, se sospechó que el ácido podía proceder de dos moléculas de este aldehido conforme a la reacción llamada de Cañizaro

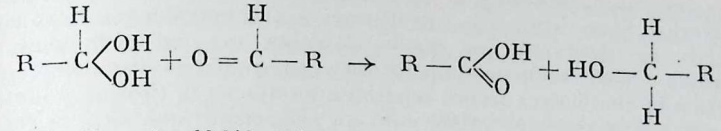
$$CH_3COH + CH_3COH + H_2O = CH_3COOH + CH_3CH_2OH$$

etanal + etanal + agua = ácido acético + alcohol

En la solución acuosa habría aldehido libre y aldehido hidratado. El grupo carbonilo no saturado del aldehido libre toma fácilmente H y pasa al alcohol primario, y al mismo tiempo el donador de H se oxida y produce el grupo carboxilo del ácido

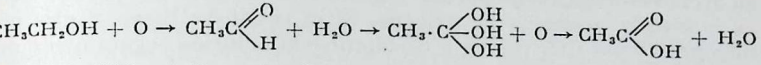


y



Aldehido libre ⇄ aldehido hidratado y éste + aquél → ácido + alcohol.

Wieland explica el paso de aldehido a ácido como una deshidrogenación en esta forma:



alcohol etilítico + O → etanal + agua → hidrato del etanal + O → ácido acético + H_2O.

Pues bien; el O que, como vemos, actúa aquí de receptor de H, se ha conseguido substituirlo por el azul de metileno y la quinona, transformándose éstos al reducirse en azul de metileno incoloro, y en hidroquinona, respectivamente, y realizándose el proceso total de oxidación del alcohol en ausencia total de oxígeno.

Se ha pensado que podría suceder que en vez de haber fermentos activadores de H, podría haberlos capaces de descomponer el H_2O en iones así $H_2O \rightarrow OH + H$ y que según fuese el substracto así actuarían los hidroxiliones una vez y los hidrogeniones otra, produciéndose así reacciones diferentes. A estos fermentos activadores de la descomposición del H_2O en HO + H se les ha llamado *perhidrasas*.

Sea cualquiera la verdadera explicación de las oxidaciones dentro de los tejidos, entenderemos que tal fenómeno existe para un determinado compuesto cuando éste, tras la reacción, se hace más rico en oxígeno, es decir, cuando el tanto por ciento de O dentro de la fórmula global del compuesto es mayor que antes de la transformación, y viceversa.

Pasaremos a describir algunas oxidasas de acción conocida y determinada en el organismo, dándonos cuenta al mismo tiempo de su importancia biológica.

Lacasa. Fué objeto de investigación por parte de Bertrand que observó que el jugo lechoso del árbol *Rhus vernicifera* en presencia del oxígeno o del aire, etc., se vuelve negro y sólido, y atribuyó este cambio a un fermento que lo llamó *lacasa*. Es notable que su acción debe ser específica, pues modifica diferentes polifenoles del jugo citado y, en cambio, no es capaz de transformar compuestos parecidos, como la tirosina que necesita otro fermento especial llamado

Tirosinasa. Existe en muchas plantas, especialmente en muchos hongos, y es también abundante en el reino animal, aunque no se sabe si son del todo idénticas las tirosinasas de distinta procedencia ya que presentan algunas diferencias en su resistencia al calor, etc.,

y se desconoce también si la tirosinasa será un solo fermento o mezcla de varios. Sometiendo a la ultrafiltración una solución con tirosinasa activa, se observará que queda detenida una parte, la cual es sensible a la elevación de temperatura y, en cambio, lo filtrado es resistente a la ebullición; ambos separados no atacan la tirosina y juntos sí, por eso se cree que existe aquí un cofermento que sería la parte que atraviesa el filtro.

La existencia de la tirosinasa se aprecia por el cambio de color del substracto, es decir, que una solución de tirosina se colorea bajo su acción de rojo, luego pardea y al fin se separan copos pardos, pero es preciso la presencia de oxígeno. Si se sustituye luego el aire por nitrógeno o por CO_2 vuelve a decolorarse la solución seguramente debido a su reducción.

La transformación de la tirosina en una materia colorante, por la acción de la tirosinasa, es apresurada por la presencia de pequeñísimas cantidades de amino-ácidos apareciendo también la coloración si en vez del fermento utilizamos bicromato potásico. La rápida coloración de la incolora o casi incolora sangre de los insectos, apenas sale de su cuerpo parece ser debida a la tirosinasa.

Fenolasas. Una de las cuales es la lacasa citada, actúan sobre los polifenoles, y también sobre los monofenoles y monoaminas aromáticas, aunque su acción es tanto más fuerte cuantos más grupos hidroxílicos o amínicos estén engarzados en el anillo bencénico.

Las fenolasas se delatan porque si añadimos agua a una solución alcohólica al 1 % de tintura de guayacol se obtiene una emulsión blanca que en presencia de una fenolasa se vuelve azul.

Según BERTRAND esto se debe a una oxidación y al mismo tiempo a una condensación del guayacol.

Se puede obtener de tejidos vegetales y animales, aunque existen diferencias entre las de diferente procedencia referentes a su desigual resistencia a cambios de temperatura. El ennegrecimiento o pardeamiento de la superficie de las manzanas cortadas, así como el azuleamiento de *Boletus* en trozos, se debe a las fenolasas que actuarían allí sobre taninos, etc.

También, según DUBOIS, existe un fermento denominado *luciferasa* que realiza la oxidación de la *luciferina*, transformándola en *oxiluciferina*, produciéndose de este modo la luz del coleóptero *Piroforus*, del molusco *Pholas*, etc.

Tratando de explicar la oxidación producida por todas estas fenolasas, se ha pensado que su acción podía ser debida a dos fermentos combinados, uno denominado *oxigenasa* que tiene la propiedad de ser fácilmente oxidable originando un peróxido, y el segundo sería una *peroxidasa* que descompondría el peróxido formado dejando oxígeno libre que oxidaría los fenoles. Conocemos casos parecidos de oxidación mediante el platino, el cual, finamente dividido, se apodera del O, toma por un átomo de Pt una molécula de oxígeno, es decir,

se forma el compuesto de PtO_2, y luego si hubiese en su presencia una substancia oxidable, le cede un átomo de O, quedándole otro utilizable todavía para otras oxidaciones.

Todo el proceso se puede formular así:

$$Pt + O_2 = PtO_2 \quad PtO_2 + R \text{ (substancia oxidable)} = PtO + RO \quad \text{y} \quad PtO + R \text{ (2.ª substancia oxidable)} = Pt + R_1O$$

Papel de estos fermentos en el organismo

Todos ellos producen, como hemos visto, reacciones coloreadas. ¿Serán ellos los que originen las coloraciones naturales de pelos, piel, hígado, etc.? Quizá la tirosina, adrenalina, triptófano, sean los puntos de partida para formar tales coloraciones, así como las de los tumores coloreados, como los melanosarcomas, etc. Ahora bien; se ha dicho que en muchos casos existen en el organismo los fermentos citados y existe el substracto, pero que sólo en presencia del aire reaccionan (casos citados de los hongos o de las manzanas que sólo se colorean al romperlos o al cortarlos, respectivamente, caso de la sangre de los insectos que sólo se colorea al salir del cuerpo, etc.). ¿Cuál será la significación biológica de estos hechos? Nada se sabe acerca de ello, quizá sea algún modo de protección, pero quizá también tengan la tirosinasa, fenolasas, etc., otras funciones totalmente desconocidas. Hoy por hoy no se sabe de estas fermentaciones con seguridad, ni siquiera si se deben incluir entre las oxidantes. Lo que parece es que su papel en el metabolismo de los productos alimenticios debe ser reducidísimo, a lo más actuarían en los cambios de las aminas y de los amino-ácidos cíclicos.

Alcoholoxidasas. Sabemos que existen bacterias que transforman el alcohol etílico en ácido acético. Todas ellas son aerobias. BUCHNER y WEISENHEIMER han podido obtener preparados durables de estas bacterias por medio de la acetona; pero, como se comprenderá, no conservándolas vivas, sino reteniendo el principio que oxida el alcohol en ácido acético. También de los tejidos animales se ha logrado extraer fermentos capaces de producir esta transformación, sobre todo del hígado, precipitando sus extractos acuosos mediante alcohol o acetona, y por rápida desecación consecutiva del precipitado.

No se sabe tampoco cuál será su papel en el organismo, es claro que tanto en el organismo animal como en el vegetal se forma alcohol y que el hombre ingiere a veces bastante de él, pero sabemos que el alcohol se descompone en gran parte en CO_2 y H_2O, así que no parece sea la oxidación del alcohol etílico el papel de tales fermentos en el organismo, quizás sea otro. BERTRAND demostró que un alcohol, la *sorbita* (procedente del fruto de *Sorbus*) se transforma en determinadas condiciones en un azúcar, la *sorbosa*, verificábdose esto por la acción de ciertas bacterias inoculadas por la *drosophila funebris*. Estas

bacterias *(Bacterium xylinium)* hacen pasar también la *manita* a *fructosa*, y es probable que produzcan también los fermentos oxidantes de los alcoholes antes citados.

Oxidación de purinas. Es interesante seguir la descomposición fermentativa de los ácidos nucleínicos que, como su nombre lo indica, integran el núcleo celular, y ahora podemos completar lo dicho sobre ello en el capítulo de las hidrolasas. Allí decíamos que mediante tres fermentos diferentes, la *nucleinacidasa*, 2.°, la *nucleotidasa* y 3.°, la *nucleosidasa*, se descomponían: 1.°, los ácidos nucleínicos en sus nucleótidos; 2.°, éstos en ácido fosfórico y nucleósidos, y 3.°, los últimos en sus bases púricas y el hidrato de carbono correspondiente. Los tres fermentos citados son hidrolasas, y ahora la descomposición de las bases púricas se continúa por fermentos del grupo de las oxidasas. Vamos a escribir la siguiente serie de bases púricas para ver la relación de composición entre ellas.

$$\text{Adenina} = C_5H_5N_5 \rightarrow \text{Hipoxantina } C_5H_4N_4O$$
$$\text{Guanina} = C_5H_5N_5O \rightarrow \text{Xantina } C_5H_4N_4O_2$$
$$\text{Acido úrico } C_5H_4N_4O_3$$

La adenina por la acción del NO_2H pasa a hipoxantina

$$C_5H_4N_4 \cdot NH + HNO_2 = C_5H_4N_4O + N_2 + H_2O$$

y la guanina por el mismo procedimiento pasa a xantina

$$C_5H_4N_4O \cdot NH + HNO_2 = C_5H_4N_4O_2 + N_2 + H_2O.$$

Si nos fijamos se verifica aquí una *desamidación*, o sea una sustitución del grupo NH_2 (amidógeno) por el oxidrilo OH. Se verá mejor escribiendo una de las dos reacciones anteriores en otra forma:

$$C_5H_3N_4 \cdot NH_2 + NO_2H = C_5H_3N_4 \cdot OH + N_2 + N_2O$$
adenina + ácido nitroso = hipoxantina + N_2 + H_2O

Pues bien; se ha demostrado que en diferentes órganos existen fermentos desaminantes que realizan el mismo papel que el ácido nitroso *in vitro*. Tales fermentos, abundantes en muchos extractos de tejidos, son la *adenasa* y la *guanasa* que hacen pasar la adenina y la guanina a hipoxantina y xantina, respectivamente. Después vienen otras oxidasas que continúan la transformación de los últimos cuerpos del siguiente modo:

$$C_5H_4N_4O \rightarrow C_5H_4N_4O_2 \rightarrow C_5H_4N_4O_3$$
Hipoxantina pasa a xantina pasa a ácido úrico

De estas dos oxidaciones son responsables dos fermentos, la hipoxantinoxidasa, de la primera, y la xantinoxidasa, de la segunda. Es de gran interés la observación de que numerosos tejidos animales realizan esta última oxidación en *ausencia de oxígeno*, pero en presencia de un *receptor de hidrógeno*, como el azul de metileno, lo mismo que decíamos al tratar de la hipótesis de Wieland aplicada al caso de la transformación del alcohol en ácido acético. El ácido úrico puede transformarse luego en alantoína mediante otro fermento llamado *uricasa* o *urocooxidasa*, precediendo a la oxidación casi con seguridad una hidrólisis y desprendiéndose CO_2

$$C_5H_4N_4O_3 + H_2O + O = C_4H_6N_4O_3 + CO_2$$

La uricasa resiste en débil reacción alcalina durante quince minutos temperaturas de 55°, pero a 70° pierde su acción. Su existencia en el organismo humano se ha discutido.

Vemos cómo el ácido úrico procede de la desintegración de los productos nucleares, y no de una oxidación incompleta de los albuminoides, como antes se creía.

Como decíamos, tiene mucho interés repetir que se ha conseguido realizar en tubos de ensayo, y mediante extractos de órganos, la descomposición de las bases púricas en la forma descrita, que es la realizada en el organismo vivo. Esto también es una prueba de que cada célula debe poseer todos estos fermentos citados, que producen la descomposición y, por lo tanto, la síntesis de la materia de su núcleo.

Se comprende la importancia que la oxidación de las purinas que acabamos de describir presenta para el médico, teniendo en cuenta que ha aclarado mucho la biología, por decirlo así, del ácido úrico y de las bases púricas cuyo papel en ciertas enfermedades, como la gota, es tan conocido.

Todos los fermentos, oxidantes o deshidrogenantes, cómo se interprete su acción, que se han descrito hasta ahora, se pueden obtener fuera de las células que los producen, en extractos, etc. Pero se ha observado que después de su extracción mediante el agua de las células de origen, quedan aún en estas materias con propiedades oxidantes, a las que Batelli y Stern las llamaron *oxidonas*. No se sabe lo que son, ni siquiera se sabe si se trata de compuestos químicos definidos. Hoy sólo se puede decir que ciertas partes de determinadas células poseen propiedades oxidantes, sin que se pueda separar de ellas el agente causante de la oxidación cuyo agente son las oxidonas. Estas son más sensibles que las oxidasas, a la acción de la acetona, alcohol, tripsina, temperatura, etc.

Abderhalden llama con frecuencia la atención sobre la necesidad de no creer que todas las reacciones intraorgánicas están influídas por fermentos, y aconseja sólo hablar de ellos cuando se posean datos ciertos para afirmar que tales fermentos existen en verdad, no cayendo en el error de hacer intervenir en cada caso obscuro o desconocido uno nuevo.

Consideraciones sobre el papel del oxígeno en el organismo. Como quiera que las oxidasas realizan su papel pasando el oxígeno en los tejidos de este a aquel compuesto, nos parece oportuno hablar de las

funciones del oxígeno en el organismo, para ver en qué momento deben actuar aquéllas y cómo pueden influir en funciones aparentemente alejadas de la acción de tales fermentos, sea cualquiera el procedimiento o teoría de la oxidación orgánica.

Sabemos que el papel reconocido como indudable para el oxígeno es la producción de *energía* para los seres vivos. Los hidratos de carbono y las grasas acaban en el metabolismo celular, por desaparecer bajo la forma de CO_2 y H_2O, dando en estos procesos de oxidación su energía total que es aprovechada por el organismo para mantener su calor o para realizar su trabajo. Los albuminoides producen el final CO_2, H_2O y además urea o ácido úrico ; la energía que podrían producir estos dos últimos compuestos orgánicos se pierde, por lo tanto, para el organismo. Pero no hay que olvidar que existe vida sin oxígeno y organismos que buscan la fuente de sus energías en otras descomposiciones no oxidativas o reductoras.

Por otra parte, hay además células y procesos que requieren cantidades grandes de O sin producir, por lo menos aparentemente, gran trabajo, como, por ejemplo, los hematíes, los óvulos, etc., que constantemente absorben O y desprenden CO_2. En particular estos últimos, en seguida de la fecundación, necesitan relativamente grandes cantidades de él, de todo lo cual se deduce que debe poseer el oxígeno otros papeles además del de libertador de energías.

Juega un papel muy importante en la excitabilidad de muchos organismos y tejidos. Muchos amibas, mixomicetos y células de los estambres de Tradescantia, dejan de moverse, según observó Kühne, en una atmósfera de hidrógeno, pierden allí su excitabilidad, que vuelven a recobrar al colocarlas de nuevo bajo la acción del oxígeno. A Max Verworn se debe el interesante experimento de sustituir por completo la sangre de una rana, por una disolución fisiológica de ClNa libre de oxígeno, le inyectaba entonces estricnina con lo cual veía que la excitabilidad de las células ganglionares medulares aumentaba hasta el máximo y hacía trabajar las neuronas bajo esta circulación sin oxígeno hasta el agotamiento. Menos de una hora basta para advertir que la excitabilidad de aquéllas ha desaparecido por completo, no se pueden ya provocar reflejos por grande que sea la excitación. Así las cosas, hacía circular una disolución de ClNa, pero esta vez con oxígeno, y notaba que al cabo de pocos minutos aparecía la excitabilidad exagerada provocada por la estricnina. Parece deducirse de esta experiencia, que el oxígeno obra aquí como indispensable para mantener la excitabilidad celular, si bien no se sabe si es el mismo directamente o si es que con su ausencia se detienen procesos de descomposición productores de substancias que serían las causantes inmediatas de tales hechos.

Se ha hablado también de almacenamientos de oxígeno en el organismo, bien sea en los músculos, cuya materia colorante es muy parecida a la hemoglobina de la sangre, bien sea en las células nerviosas, o en el núcleo celular, sin haber observaciones suficientes para

poder afinarlo, aunque parece ser que tales acumulaciones, de haberlas, no juegan ningún papel importante.

Por último, un asunto sobre el que viene fijándose la atención tocante al papel del oxígeno y de las oxidasas, es el referente a *las analogías entre la respiración celular con la fermentación alcohólica.* Se han demostrado procesos respiratorios, es decir, absorción de O y eliminación de CO_2 en órganos, trozos de tejidos, etc., separados del ser, pero vivientes. Batelli y Stern habían observado que cuando la substancia muscular se coloca en agua durante algunos minutos, y se separa luego por filtración a través de un paño, el agua, de la parte sólida, no presenta ésta ya procesos respiratorios ; es decir, no se aprecian cambios de O y de CO_2, ni en lo sólido que quedó en el paño ni en el líquido separado por filtración; si, en cambio, se reúnen ambos se aprecia en seguida un vivo cambio respiratorio de los gases atacados. Ya hablamos de las analogías entre la respiración y la fermentación de la glucosa por los sacaromices respecto a su mecanismo; ambos necesitan la presencia de una substancia dializable resistente a la cocción. Pues bien; podemos nosotros obtener por cocción de los sacaromices o de los músculos estas substancias que deben ser cofermentos, siendo lo notable que ambos pueden servir indiferentemente para los dos procesos. Es decir, que si privamos al jugo de los sacaromices, por dialización de su cofermento y con esto suprimimos su poder de provocar la fermentación del azúcar, y si, por otra parte, privamos de respiración a una pulpa muscular, por haberle separado mediante el agua su cofermento, en ambos casos podemos hacer reaparecer las respectivas funciones con cualquiera de los dos cofermentos indiferentemente. Quizá se trata en ambos casos de la misma cosa, es decir, de una substancia que crea condiciones apropiadas para mantener el estado favorable de aquellos productos (fermentos) que directa o indirectamente aceleran los fenómenos atacados.

Sobre el papel del oxígeno y de la catalasa en el trabajo muscular. Meyerhof [1] resumió, en Estocolmo (con motivo de haber sido agraciado con el premio Nobel), en un discurso, las ideas actuales sobre este punto, continuando después con una explicación admirable, referente a la relación que existe entre las calorías producidas en las reacciones, que pronto vamos a indicar, y la energía aparecida en los procesos de contracción muscular. Esta segunda parte se sale bastante de nuestro objeto, por eso nos limitaremos sólo a hablar de la primera.

Una primera observación de importancia fué la realizada por los ingleses Fletchter y Hopknis de que la formación de ácido láctico en el músculo estaba en íntima relación con la contracción muscular. Antes, Hermann había demostrado el hecho paradójico de que el músculo en completa ausencia de oxígeno podía producir una considerable cantidad de trabajo exterior. Como es evidente, por

(1) Otto Meyerhof, *Die Energienumwandlungen in Muskel.* Discurso pronunciado por su autor en Estocolmo el 12 de diciembre de 1923.

otra parte, que la única fuente de energía del trabajo muscular tiene que ser al fin la oxidación de los alimentos que recibe, se dedujo que la relación entre el trabajo de los músculos y su fuente la combustión apropiada, debía ser indirecta. Ya los dos autores primeramente citados vieron que en los músculos en ausencia de oxígeno aparece ácido láctico, poco en el reposo, más en su actividad, y observaron también que este ácido láctico luego en presencia del oxígeno desaparece transformándose como pronto se dirá.

El oxígeno, por lo tanto, actúa no durante el trabajo, sino en el período de reconstitución del músculo. Sólo faltaba coordinar estos datos, aclarar la relación que podía haber entre la formación del ácido láctico y la correspondiente liberación de energía para el trabajo muscular, etc. Y esto lo comenzó a hacer HILL, de Londres, quien dijo que el calor de contracción muscular se producía en dos fases separadas, y en cantidad casi por igual en ambas. En una de estas fases es en la que se produce el trabajo muscular, y se realiza tanto en ausencia como en presencia de oxígeno; al calor producido en ella se llamaba *calor inicial*. Y en la segunda fase, que sólo se verifica esencialmente en presencia de O, se forma el calor que llamó *calor retrasado*, cuya producción de calor la ponía él en relación con la desaparición del ácido láctico producido en la primera. MEYERHOF, con todos estos datos, analizó los hechos del modo siguiente: Hacía trabajar un músculo de rana separado del cuerpo, dándole la máxima provisión de oxígeno, el análisis le demostró que desaparece, en estas condiciones, cierta cantidad de glicógeno del músculo, así como la correspondiente cantidad de oxígeno de la atmósfera que le rodea, que se enriquece de CO_2, vió que el O que desaparece es precisamente el que cuantitativamente se necesita para quemar aquél. En una segunda experiencia hacía trabajar el músculo en condiciones anaerobias primero, y luego en presencia de oxígeno, y observó que durante la *fase anaerobia* desaparecía el glicógeno en la medida que se producía el ácido láctico y en proporción con el trabajo realizado. En esta fase, las cantidades de otros hidratos de carbono, en especial de glucosa libre, y de una combinación de una hexosa con el ácido fosfórico denominada ácido hexosadifosfórico, descubierto por EMBDEN, apenas varían. En cambio, en la *segunda fase o aeorobia* desaparece el ácido láctico, $^1/_4$ de él (en caso de cansancio total del músculo) absorbiendo oxígeno exactamente en la cantidad necesaria para quemar el ácido láctico; y los $^3/_4$ restantes se convierten en glicógeno nuevamente.

Resume así las reacciones en las dos fases.

Fase aerobia o primera

$$5/n\,(C_6H_{10}O_5)\,n + 5\,H_2O + 8\,H_3PO_4 \rightarrow$$
Glicógeno + Agua + Acido fosfórico

$$\rightarrow 4\,C_6H_{10}O_4(H_2PO_4)_2 + C_6H_{12}O_6 + 8\,H_{20} \rightarrow$$
Acido hexosadifosfórico + Glucosa + Agua

$$\rightarrow 8\,C_3H_6O_3 + 8\,PO_4H_3 + C_6H_{12}O_6$$
Acido láctico + Acido fosfórico + Glucosa

Fase oxidativa o segunda

$$8\,C_3H_6O_3 + 8\,PO_4H_3 + C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow$$
Acido láctico + Acido fosfórico + Glucosa + Oxígeno

$$\rightarrow 4\,C_6H_{10}O_4\,(H_2PO_4)_2 + 6\,CO_2 + 14\,H_2O \rightarrow$$
Acido hexosadifosfórico + Anhídrido carbónico + Agua

$$\rightarrow 4/n\,(C_6H_{10}O_5)n + 8\,H_3PO_4 + 6\,CO_2 + 12\,H_2O$$
Glicógeno + Acido fosfórico, etc. (1)

Vemos que en la fase anaerobia el glicógeno se transforma en ácido láctico, pasando por el ácido hexosadifosfórico, y pasando también por glucosa. En la segunda fase, en cambio, la transformación es inversa, regenerándose los componentes primitivos, con la única diferencia de que dos moléculas de ácido láctico o, si queremos, una de azúcar se quema y, por lo tanto, el glicógeno total disminuye, y se produce CO_2 y H_2O.

Todo esto es muy importante porque, según MEYERHOF, esto es precisamente lo que sucede en el músculo en reposo. Si el músculo encuentra O suficiente, el glicógeno pasa a CO_2 y H_2O, pero si le detiene en una atmósfera desprovista de oxígeno y después en otra con suficiente cantidad de él, se observa una acumulación del ácido láctico en la primera fase, y su transformación durante la segunda en la forma y medida dicha para el músculo en trabajo de la experiencia.

En ambos casos, en el individuo vivo el oxígeno estaría producido por las oxigenasas, probablemente por la catalasa, en la forma dicha al hablar de este fermento.

La diferencia de velocidad de las reacciones en el músculo que se contrae respecto con la de las del músculo en reposo, cree MEYERHOF que sería debido a que el estímulo de la contracción tiene la propiedad de hacer permeables instantáneamente, las membranas que separarían los elementos reaccionantes.

Se alejaría por completo de este trabajo el resumir o traducir la parte del discurso referente al cálculo de las calorías producidas en estos cambios; al papel de los albuminoides como *reguladores* « Puffer » de la concentración de hidrogeniones, dentro de los límites estrechos en que esta concentración se conserva aun en el caso de máximo cansancio, o sea en el de máxima producción de ácido láctico, pues el valor de *ph* sólo varía de 7,5 a 6,8. Sólo diremos que los albuminoides son

(1) Adviértase que según esta teoría ha quedado sentada la extraña consecuencia de que en la primera fase, la energía química se transforma en trabajo *directamente*, sin producción previa de calor; éste se produce al oxidarse el ácido láctico en la segunda fase en que no se produce trabajo alguno. Los músculos no son, pues, comparables con motores térmicos, como antes se creía.

desprovistos de sus álcalis por el ácido láctico, con lo cual quedan desionizados e isoeléctricos; en la segunda fase, al desaparecer el ácido láctico, los álcalis que estaban unidos a él quedan a disposición de las proteínas, que nuevamente se ionizan al pasar a alcaliproteínas, y con esto y la reconstitución del glicógeno queda el músculo en su primitivo estado dispuesto a la contracción.

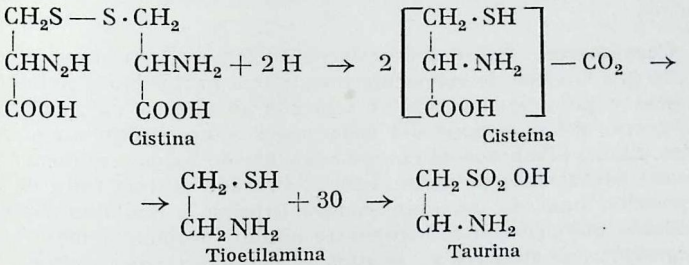
MEYERHOF, mediante sus cálculos, ofrece una imagen relativamente sencilla de lo que deben ser los cambios de energía dentro del músculo; pero con estas breves líneas sólo hemos pretendido hablar de los cambios químicos de la contracción y del papel del oxígeno y de las oxidasas en ella, dejando además la cuestión que es más bien de orden físico o físico-químico referente a la esencia de la contracción que está lejos de estar tan aclarada como la citada cuestión termodinámica del trabajo muscular.

Procesos debidos a carencia de ciertos fermentos en el organismo. Al hablar de cada fermento hemos dicho cuál era su acción. Unas veces coincide su función en el organismo con la que vemos realizarse por su influencia en los tubos de ensayo en el laboratorio, como sucede en el caso de los fermentos proteolíticos, carbohidrasas, etc.; otras, es muy dudoso que su papel en el organismo sea el mismo que nos sirve para delatar su presencia en el laboratorio, caso de las fenolasas, tirosinasa, etc., pues no se ve bien que ventaja puede sacar el organismo de tales reacciones. Deben, además, los organismos disponer de muchos más fermentos que los hasta hoy conocidos, y es cosa relativamente frecuente el hallazgo de nuevos aceleradores para reacciones biológicas. En sectores extensos de la Biología, como es en las cuestiones de herencia, en la mecánica del desarrollo, etc., apenas si se ha iniciado la aplicación a ellos para la resolución de sus cuestiones, eso que biólogos de la importancia de GOLDSCHMIDT han indicado que es muy probable que en el determinismo de lo que va a ser cada célula a partir de las primeras divisiones del huevo juegan los fermentos un papel decisivo. Y es que hasta que no se resuelva el problema nudo de la cuestión, es decir, hasta que no se averigüe qué son esencialmente los fermentos, resulta muy difícil extender su aplicación a nuevas disciplinas. Por eso hay que limitarse hoy a lo conocido con seguridad, que seguramente es muy poco en relación con lo que se conocerán en el porvenir.

Esto mismo se puede aplicar a la patología de los fermentos, por decirlo así, en donde nos limitaremos a indicar sólo los casos que se atribuyen hoy a carencia de ciertos de ellos conocidos. Por jugar en la nutrición de los organismos un papel tan importante, su ausencia se revelará especialmente en la aparición de compuestos, situados en la escala de descomposición de albuminoides, grasas o hidratos de carbono, y que permanecen como tales sin descomponerse, precisamente por faltar al organismo el fermento *ad hoc*. Siendo estos cuerpos intermediarios extraños a la composición normal de nuestros jugos, deberán

desaparecer de allí y de ello se encargan los riñones, que los hacen aparecer en nuestra orina. Tales procesos son las amino-acidurias en general, y la cistinuria en particular, la diaminuria y la alkaptonuria, referentes a falta de descomposición total de los albuminoides. También aquí se debe incluir la gota que, como dijimos, debe proceder de un mal metabolismo de los compuestos del núcleo. Respecto al metabolismo fermentativo anormal de los hidratos de carbono citaremos la pentosuria. Y por fin, como caso de metabolismo anormal de éstos y de las grasas, citaremos la aparición en los diabéticos de los ácidos butírico y derivados como la acetona. Hemos dicho, además, que hay muchos fermentos que producen reacciones colorantes, por lo cual es muy fácil que jueguen un papel importante, en el albinismo, etc., y otros procesos cuyos síntomas se achaquen a falta de pigmentos

Cistinuria. Se llama a la aparición de un amino-ácido la *cistina* en la orina. La cistina procede en el organismo de dos orígenes, uno es el intestino en donde se produce como otros amino-ácidos de la descomposición de las proteínas alimenticias, y otro está en el seno mismo de los tejidos en cuyos procesos metabólicos, aparecen por descomposición de las proteínas celulares los amino-ácidos, lo mismo que en el intestino, según ABDERHALDEN. Sea cualquiera su origen, la cistina es utilizada por las células del organismo y por consiguiente por el hígado que recoge sobre todo la procedente de los alimentos y la transforma en taurina.

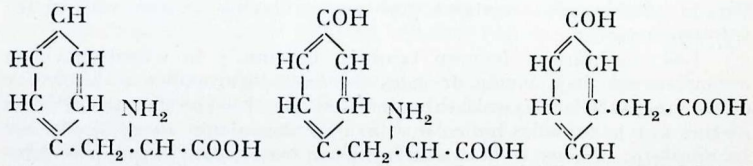


Siendo posible que la cisteína pase por oxidación a ácido cistinúrico y luego a taurina.

Los cistinúricos forman también taurina y la expulsan como normalmente, bajo forma de sales del ácido taurocólico o derivados de él, mediante la bilis en el intestino. Así que el hecho de que excreten cistina por la orina no indica que tal descomposición en el hígado sea incompleta, sino que es la que se forma en los tejidos, la que por carecer de fermentos adecuados no se descompone y aparece en la orina. Es una enfermedad rara y familiar, según observación de ABDERHALDEN, muy a menudo va acompañada de *diaminuria* y de *aminoaciduria* (sobre todo presencia de leucina y tirosina en la orina), pero también se presenta la cistinuria sola. Se ve que les faltan a estos enfermos

los fermentos necesarios para acabar la descomposición de los albuminoides, es decir, para llevar a cabo la destrucción de los materiales finales de su construcción que son los amino-ácidos. Como estos fermentos deben ser específicos, se comprende que unas veces sea uno, otras, otro amino-ácido el que queda sin descomponer y aparece en la orina. Pierden, por lo tanto, tales enfermos una fuente grande de energías al no acabar de consumir tales materiales. Los que sólo tienen cistinuria soportan, por lo menos, al principio muy bien su enfermedad. Tampoco es grave la *diaminuria* caracterizada por la expulsión de la orina de diaminas, especialmente de *cadaverina* y de *putrescina*. La cistinuria suele descubrirse porque la cistina produce la formación de cálculos nefríticos y de la vejiga. Como es muy poco soluble en el agua, si va en la orina segregada precipita en seguida, bien en la misma pelvis renal, bien en la vejiga de la orina adquiriendo a veces grandes tamaños. Como en el caso de otros cálculos, es su paso por los uréteres o por la uretra por los accidentes que provocan: dolores, heridas de los conductos, retenciones urinarias, los que llaman la atención del médico. Casi todos, además, tienen dolores en músculos y articulaciones, debido quizá a que se precipita también allí la cistina. En un niño cistinúrico pudo observar Abderhalden infiltraciones espesas de cistina en los órganos bajo la forma de cristalitos típicos de ésta. Se sabe que la cistina es uno de los aminoácidos que, como la tirosina, se descubrieron desde muy antiguo precisamente por su insolubilidad que originaba su precipitación en la orina de los cistinúricos.

Alcaptonuria. Fué descubierta en 1859 por Boedeker, el cual observó que la orina de estos enfermos poseía propiedades reductoras enérgicas y que dejada al aire en reacción alcalina se colorea pronto de obscuro, al fin se pone del todo negra y precipitan unos copos pardos. Llamó alkaptona al cuerpo causante de estos fenómenos que precipita con acetato de plomo básico. Procede de una falta de descomposición final de los amino-ácidos tirosina y fenilalanina, cuyo parentesco químico con el compuesto citado también llamado *ácido homogenístico*, se advierte en seguida al comparar sus fórmulas.



Acido β-fenil-α-amino-propiónico o *Fenilalanina*

Acido β-p-oxifenil α-amino-propiónico o *Tirosina*

1,4 oxifenil 3 ácido acético o *Acido homogenístico*

Se ha administrado a los alcaptonúricos tirosina y fenilalanina y se ha observado, como se esperaba, que aparecía el ácido homogenístico en la orina. Según Abderhalden, son éstos enfermos sujetos apropiadísimos para estudios sobre transformaciones de albuminoides en el organismo, pues se puede seguir en ellos muy bien la marcha del nitrógeno y del azufre que ingieren al comer aquéllos. Se creía que la formación del ácido homogenístico tenía lugar en el intestino bajo la influencia de bacterias, pero hoy se admite que se forma en los tejidos. En muchos casos el alcaptonúrico no descompone nada tirosina ni fenilalanina, ambas se convierten totalmente en alcaptona. Se pensó que quizá estos individuos no poseerían ninguno de los dos amino-ácidos citados en sus proteínas celulares, pero se ha visto que éstas contienen igual proporción de ambos que los demás.

Abderhalden, Bloch y Rona para acabar de cerciorarse de que el ácido homogenístico se produce en el seno de los tejidos, realizaron la inyección subcutánea de glicil-l-tirosina y vieron que efectivamente se producía alcaptona. Es seguro, pues, que en el curso de los cambios nutritivos que se verifican en los tejidos se forman toda clase de amino-ácidos y entre ellos la tirosina y la fenilalanina de donde procede el ácido homogenístico.

Desde el punto de vista clínico no tiene importancia, pues los alcaptonúricos no presentan síntomas alarmantes. Esta anomalía suele ser hallazgo de los hospitalizados a quienes sorprende el obscurecimiento de su orina; se trata, pues, de una anomalía de los cambios nutritivos más importante desde el punto de vista especulativo que del práctico. También el cerumen del oído de los alcaptonúricos suele ser obscuro. Si a un individuo normal se le administra per os mucha tirosina se consigue que presente alcaptonuria, lo cual hace suponer que el proceso normal de la digestión en los tejidos de la tirosina y de la fenilalanina pasa por el ácido homogenístico antes de llegar a la descomposición total, la enfermedad consistiría, por consiguiente, en una paralización del proceso en esta etapa, por faltar los fermentos necesarios para continuar la descomposición, o por faltar los activadores o las condiciones apropiadas al buen funcionamiento de tales fermentos.

Es también hereditaria la alcaptonuria, siendo muy curioso que se repita este hecho indicado ya en la cistinuria.

Ocronosis. Está a veces en relación con la anterior, a los pacientes se les ennegrece la piel, cartílagos, tejido fibroso, etc. No se sabe todavía la relación que pueda tener con el ácido homogenístico, pues existen también ocronósicos sin alcaptonuria. Las variaciones de los cartílagos en los ocronósicos pueden ser causa de artritis deformantes. Es también forma familiar y congénita. Los enfermos están desmejorados pero no incapacitados.

Todos estos procesos indican que en los tejidos se forman amino-ácidos y que éstos no se descomponen en tales casos por completo. Las células del organismo cuentan no sólo con los amino-ácidos procedentes del intestino, sino con los que ellas mismas producen por descom-

posición de las proteínas mismas celulares, para cuya digestión disponen de fermentos que faltando provocan los síntomas indicados.

Quizá fuese indicado hablar aquí de la aparición exagerada de *indican* en la orina. El indican proviene del indol que se oxida en el cuerpo, produciendo el indoxil que combinándose con el ácido sulfúrico forma el indican $C_8H_7NSO_4$. Inyectando indol a un individuo aumenta mucho la *indicanuria*. Es sabido que el indol es un producto de la putrefacción de los albuminoides y desde luego aparece en aquellas enfermedades en que por hallarse estancadas las substancias en el intestino se produce la putrefacción de los productos cuaternarios y con ello el indol, el cual reabsorbido y modificado en los tejidos origina el indican. Ligando el intestino delgado ha provocado JAFFÉ la producción de una gran cantidad de indican, no así al ligar el grueso. Cualquier putrefacción en el cuerpo fuera del intestino puede originar indol y, por lo tanto, exagerada indicanuria, pero según BLUMENTHAL y ROSENFELD puede también proceder el indican no ya de una putrefacción, sino sencillamente de una desintegración exagerada de los albuminoides de los tejidos en régimen de hambre, de envenenamiento con la floricina, etc., por esto, por proceder quizá de fermentaciones exageradas o anormales se podría hacer la presente indicación, aunque la mayoría niegan la última procedencia del indican urinario. Para la generalidad proviene el indol de la putrefacción, sobre todo de la intestinal, y es obra, por lo tanto, microbiana.

Pentosuria. Algunos incluyen entre las anomalías del metabolismo de los hidratos de carbono, debido a carencia de ciertos fermentos, la emisión por la orina de determinadas pentosas, ocasionando este síntoma denominado *pentosuria*, pero el hecho es que no se conoce bien la causa de tal anomalía. Las primeras observaciones proceden de SALKOWSKI y JASTROWITZ que observaron que la orina de un morfinómano contenía una substancia muy reductora (como la glucosa), pero que ni fermentaba ni tenía acción sobre la luz polarizada, había que excluir, por lo tanto, la posibilidad de que tal substancia fuese el azúcar de uva, ellos mismos averiguaron que se trataba de una pentosa. Se creyó al principio que podía proceder de una pentosa ingerida con los alimentos, pero no se ha encontrado tal relación entre la pentosuria y la alimentación aunque BLUMENTHAL la ha observado, según dice, repetidas veces después de comer frutas y jugo de frutas. Los estudios de A. KOSSEL HAMMARSTEN, etc., demostraron posteriormente que muchos ácidos nucleínicos encierran pentosas en su constitución, así que este podía ser también origen de las de la orina. Según NEUBERG se trata en la pentosuria de la aparición en la orina de la especie ópticamente inactiva de la arabinosa. LUZZATTO ha encontrado la l-arabinosa. Como se deduce de estas líneas, ni se ha aclarado todavía la naturaleza de la pentosa de tales orinas ni se puede decir cuál es su origen.

Como conclusión curiosa referente a estos estudios de anomalías en la descomposición normal de las grasas, se puede citar el descubrimiento de la *intarvina*, grasa sintética utilizada para alimento de los diabéticos. Como se comprenderá, es una orientación completamente distinta a la que representa el descubrimiento de la *insulina* en el tratamiento de la diabetes, no siendo esta última cuestión propia del objeto de estas líneas, pues, como se sabe, se trata de corregir con la insulina defectos en el funcionamiento de hormonas no de fermentos.

Sabido es que en los diabéticos es necesario vigilar mucho la producción de la acidosis de la sangre, ocasionada por la formación en ellos del ácido butírico y derivados entre los que se encuentra al fin la acetona, que excretan por la orina y por el aire espirado. Es indudable que la acetona puede originarse en la descomposición ciertos amino-ácidos procedentes de albuminoides, como, por ejemplo, en la desintegración de la leucina del ácido α-amino-valeriánico que por desaminación, etc., pueden originar primero el ácido butírico, luego la serie que después indicaremos y, por fin, la acetona ; otros amino-ácidos como la valina no pueden originar la serie citada, todo depende del número y configuración de los átomos de carbono que los forman. EMBDEN lo ha comprobado esto experimentalmente, haciendo circular diferentes amino-ácidos a través del hígado viviente *in vitro*. En individuos caquécticos, o en períodos de abstinencia, etc., debe ser éste un origen apreciable de la acetona que excretan.

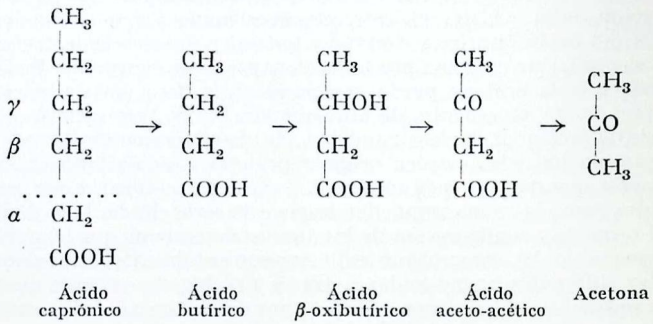
Por el contrario, parece ser que los hidratos de carbono no contribuyen a su formación; es más, al excluirlos de la alimentación puede provocarse en los no diabéticos acetonuria, sin duda por obligar al organismo a consumir otros principios inmediatos, y si nuevamente administramos a estos sujetos un régimen con hidratos de carbono desaparece otra vez la producción de acetona. Así que en el hombre, por lo menos (en los perros es diferente), los hidratos de carbono son más bien substancias opuestas a la producción en el organismo de productos acetónicos.

También se ha demostrado que es posible la formación sintética de acetona en el organismo. Pero tanto la sintética como la producida en el metabolismo anormal de los albuminoides, se considera hoy que es en cantidad que no se debe tener en cuenta, comparada con la producida al descomponerse en los diabéticos las grasas. *En ellos se admite hoy como fuente principal de la acetona las grasas.* Sabido es que *todos* los ácidos grasos de las grasas naturales tienen un número par de átomos de carbono ($C_{18}H_{36}O_2$, $C_{16}H_{34}O_2$, etc.). Por otra parte, desde los trabajos de KNOOP (1905) y de EMBDEN (1906) se sabe que la descomposición de los ácidos grasos normales tiene lugar de un modo muy particular. Se verifica siempre una pérdida de *dos* átomos de carbono, cada vez, y la ruptura se verifica entre el carbono α y el β. Se sabe que el carbono α es el que se une al grupo carboxilo y el siguiente es β, etc., ejemplo : $CH_3 \cdot CH_2 \ldots\ldots CH_2 | CH_2COOH$, etc.,

etc. $\ldots\ldots$ β α

la línea de puntos indica el sitio de ruptura. Por eso como todos los ácidos grasos normales tienen un número par de átomos de carbono

y experimentan al descomponerse, según queda dicho, una pérdida de ellos de dos en dos, acabarán por producir, finalmente, uno que tenga cuatro átomos de carbono o sea el butírico, y éste por oxidación produce muy fácilmente la peligrosa serie, formada por el ácido β-oxibutírico, ácido aceto-acético, y por fin la acetona. Como se ve, tomando un ácido graso par cualquiera, sea el caprónico.



Los diabéticos que excretan por la orina y al respirar acetona presentan, como es fácilmente explicable viendo la derivación anterior, una acidosis, que disminuye la aptitud de su sangre para los cambios íntimos respiratorios, especialmente para la expulsión del nocivo CO_2. Mueren generalmente en coma provocado por la acidosis, cuya acidosis es producida por un desaprovechamiento de sus hidratos de carbono que ocasiona una descomposición patológica de las grasas.

Basándose en estas ideas, los doctores KAHN y NOLAN sospecharon que si se dan al diabético grasas sintéticas que *no tuviesen un número par de átomos de carbono, sino impar* ($C_{17}H_{34}O_2$, $C_{15}H_{30}O_2$, etc.), no se podrían producir al fin el ácido butírico que tiene cuatro átomos de carbono, ni, por lo tanto, la peligrosa serie de él derivada. Lograron sintetizar una tal grasa y la llamaron *intarvina* $(C_{16}H_{33}COO)_3H_5I$ que significa grasa intermediaria, y fué ensayada en el Beth-Israel Hospital de New York City, observándose que pronto los enfermos veían su acidosis curada lo mismo que su hambre punzante, tras de lo cual venía una reconstitución rápida; claro que esto no significaba la curación de su diabetes, pues al tomar de nuevo las grasas naturales corren otra vez el peligro de la acidosis. Se observará por estas cortas líneas que esta orientación es por completo diferente que la teoría hoy ya de carácter práctico para el tratamiento de la diabetes que condujo al descubrimiento de la *insulina*.

Añadiremos algunos datos interesantes sobre la intarvina, procedentes de la nota de RALPH H. MC. KEE del 9 de octubre de 1923 publicada en *Die Naturwissenschaften* el 23 de noviembre de 1923. La grasa artificial intarvina tiene el mismo aspecto y sabor, etc., que

las naturales. Producto primero de laboratorio ha llegado a hacerse industrial, producido por una fábrica de Long Island City. Para aumentar su ya fácil digestibilidad se ha añadido 10 % de aceite mineral sin gusto, con lo cual el punto de fusión se ha logrado que baje hasta ser el de la temperatura del cuerpo.

Las dos primeras libras que de ella se obtuvieron costaron 300 dólares, pero el precio de venta llegó a 9 dólares la libra, necesitando un paciente una libra cada dos semanas. Hasta el momento han sido tratados 150 enfermos y se ha conseguido la desaparición de la acidosis en todos.

Sobre fermentos defensivos del organismo. Se ha hablado ya de ellos al tratar de los métodos de ABDERHALDEN para delatar algunos de ellos. Los trabajos de este investigador que le condujeron a su descubrimiento comenzaron por el hallazgo de que al inyectar en la sangre diferentes substancias químicas se producían en ella fermentos, no nos referimos a otros anticuerpos cuya naturaleza puede ser variadísima. Así, el plasma puro de un perro no produce la inversión del azúcar de caña, pero si el plasma procede de un perro previamente inyectado de sacarosa en su torrente circulatorio, se observa que posee la propiedad de invertir la sacarosa. Esto se advierte fácilmente observando los cambios del poder rotatorio sobre la luz polarizada de la disolución del azúcar citado en presencia del plasma del segundo caso. Es claro que tales cambios se deben atribuir a la presencia en aquel plasma de invertasa, dura bastante este fermento allí, y según dice TURRÓ: «Es más probable que de inyectar espaciadamente la solución, como lo hace el inmunólogo con sus cultivos, esa propiedad reaccional persistiría indefinidamente» (1). Después de este estudio continuó ABDERHALDEN en la busca de fermentos proteolíticos y el resultado de estas investigaciones fué el hallazgo y el empleo de sus métodos para la investigación clínica y diagnóstico prematuro del embarazo, como someramente se indicó en el capítulo I. Mucho se ha discutido si la reacción citada, llamada según su descubridor, era específica o no, o lo que es lo mismo si los fermentos formados en la sangre eran específicos o no. ABDERHALDEN y su escuela, así lo creen y son muchos los análisis que se hacen diariamente en su Instituto con sueros procedentes de diferentes hospitales de Alemania, pareciendo cada vez más que efectivamente dichos fermentos poseen una marcada especificidad. Es decir, que el individuo enfermo del hígado o del tiroides, etc., posee fermentos proteolíticos en su plasma sanguíneo que actúan solamente sobre las proteínas obtenidas de hígado o de tiroides, etc., respectivamente.

Respecto a tantos otros conceptos que son corrientes en Inmunología, en la mayoría de los casos no se trata de fermentos; nos refe-

(1) TURRÓ, *Los fermentos defensivos en la inmunidad natural y adquirida.* Madrid, 1920, 2.ª ed., pág. 33.

rimos a precipitinas, aglutininas (1), etc., y tantos otros anticuerpos en general, que es muy fácil que sean substancias que a modo de los cofermentos, antifermentos, etc., modifiquen el medio o el substracto produciendo las reacciones inmunológicas de muchas de las cuales es probable que será necesario buscar la explicación en la química coloidal. Por esto no parece oportuno tratar de tales cuestiones, más teniendo en cuenta que poseemos en castellano un libro excelente (el que acabamos de citar) del notable biólogo español señor TURRÓ referente a este asunto.

(1) Algunos incluyen a las toxinas entre los fermentos. Como quiera que se sabe muy poco respecto a la constitución de aquéllas, que en algunos casos su acción es manifiestamente diferente de la de los fermentos, y como la tendencia general de los autores es la de tratar separadamente ambos estudios, siendo objeto el de las toxinas de una rama especial, por todo ello no tratamos aquí de esta cuestión.

APÉNDICE I

Algunas fórmulas para obtención de fermentos

Ya hemos indicado en el primer capítulo algunas generalidades sobre esta cuestión; también al hablar de cada fermento en particular se ha dicho cuál era la fuente de que se suele hacer uso en los laboratorios con más frecuencia para obtener cada uno de ellos. Deseando ahora precisar lo que son estas recetas de obtención de fermentos, vamos a copiar las más sencillas indicadas para los más comunes, aconsejando para el que quiere encontrar más fórmulas, detalles y bibliografía, recurrir a la obra de que tomamos estos datos, titulada *Allgemeine Darstellungsmethoden der fermente*, autor SIGMUND FRÄNKEL, de Viena; es un cuaderno del *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, publicado bajo la dirección de E. ABDERHALDEN: es el capítulo IV, tomo I, cuaderno 1.°

Pepsina libre de lab. Suele extraerse de la mucosa del estómago de cerdo. Según van HASSELT, se tritura dicha mucosa y se la deja diez a quince días en una solución al 5 % de ClNa a la temperatura ordinaria, luego se satura con ClNa con lo que se separa por precipitación el lab y se filtra, ya filtrado se dializa el líquido para separar el ClNa y se satura con $SO_4(NH_4)_2$. Se filtra nuevamente el precipitado, se disuelve en agua, y se dializa contra una solución al 0,2 % de ClH. La solución obtenida no tiene lab y es rica en pepsina. Van HASSELT, recomienda partir de mucosa ya seca, pues así se eliminan muchas substancias extrañas y la solución final resulta más enérgica.

En la *industria* se toman 100 kg. de mucosa de estómago de cerdo, 125 litros de agua, 1 litro de ClH concentrado y 150 gr. de cloroformo, se mezcla todo bien y se deja la mezcla en frío. A las veinticuatro horas se filtra y el líquido se evapora en el vacío a 40°, hasta un cuarto del volumen primitivo, se vuelve a filtrar y se vuelve a concentrar en el vacío a la más baja temperatura posible. De 100 kg. de mucosa se obtienen 8 a 10 kg. de pepsina del comercio.

Lab. Suele obtenerse de la mucosa del estómago de ternera. Según FRIEDBERG-BLUMENTHAL, se la deja durante un día en digestión en una solución al 0,5 % de ClNa a 30°, se filtra y lo filtrado se hace que quede con un 1 % de ácido y se deja a 30°, se filtra otra

vez y se vuelve a restablecer la proporción de 1 % de ácido, se satura entonces con ClNa y se deja varios días a la temperatura de la sangre. Se separan así unos copos blancos de chymosina (lab) que se recogen por filtración y se secan. El producto es soluble en el agua y se conserva así indefinidamente. Del líquido filtrado se puede precipitar la pepsina por neutralización, y la pepsina obtenida no tiene ninguna acción sobre la leche. GÄRTNER extrae el fermento lab de las plantas.

Tripsina. Se suele partir del páncreas de cerdo, o de vaca. DANILEWSKY, toma páncreas fresco de cerdo lo tritura en un mortero con arena y agua, deja reposar el líquido decantado y lo filtra a través de un tejido. Añade luego a lo filtrado magnesia con lo que precipita la *diastasa* que se separa por filtración, y la solución separada, se acidifica con ácido fosfórico y se neutraliza con cal. El fosfato cálcico encierra la *lipasa* que se separa por filtración y la solución rica en *tripsina* se evapora en el vacío.

La separación de la tripsina y de la diastasa se puede hacer también por medio de una solución diluída de colodión, después de añadir ésta al líquido obtenido del páncreas, como queda dicho, se agita todo, y se forma un precipitado que arrastra la tripsina mientras que la diastasa queda en disolución.

Pancreatina. O sea la reunión de todos los fermentos del páncreas. Según la farmacopea francesa, para una parte de páncreas se toman dos de agua a la que se añade algo de cloroformo. El páncreas ha sido limpiado previamente, mediante la tijera, de grasa y de vasos. Tras algún tiempo se filtra, separando lo no disuelto, se prensa esta parte y el líquido así obtenido se evapora a baja temperatura mejor en el vacío. La maceración debe durar seis horas.

Erepsina. Se lava el intestino delgado de un perro sacrificado en plena digestión, se separa su mucosa, se la tritura con arena, se añade solución fisiológica de ClNa, toluol y se macera durante algunos días. A dos partes de este jugo de maceración se añaden tres de solución saturada de $SO_4(NH_4)_2$. Se deja reposar el precipitado y se filtra. Lo precipitado se agita en agua y se dializa para separar el $SO_4(NH_4)_2$ se filtra nuevamente, y el líquido obtenido representa una solución del fermento que encierra pocos albuminoides.

Polipeptidasa. Véase capítulo primero.

Amilasa. Puede obtenerse la del páncreas partiendo del polvo de pancreatina, el procedimiento es algo complicado y además el preparado tiene propiedades proteolíticas siguiendo el método indicado por FRÄNKEL, por eso no lo transcribimos. En su lugar indicaremos como preparado de propiedades amilolíticas, la ptialina obtenida según COHNHEIM: Se trata de saliva con Cl_2Ca y fosfato sódico, se forma así un precipitado de fosfato cálcico que se lava con agua, se disuelve éste en ácido acético muy diluído se dializa y se precipita la solución acuosa con alcohol.

Diastasa. Se extrae de la malta, es decir, de la cebada germinada preparada para fermentar, bien sea fresca o tostada. En el procedimiento de LINTNER se toma una parte de malta y se coloca durante un día en dos o cuatro partes de alcohol al 20 %, se filtra y se precipita con 2 a 2,5 partes de alcohol absoluto, el precipitado formado que se apelotona, se filtra rápidamente al vacío, se frota en un mortero con alcohol absoluto, se lava con alcohol absoluto y éter y se seca en el vacío.

Lactasa. Se obtienen soluciones de lactasa muy activas y estériles, extrayéndola mediante agua saturada de éter, de la mucosa de todo el intestino delgado limpiada mecánicamente.

Sacarasa o invertina. Se suele echar mano de la levadura (sacaromices) que se utiliza para la panificación, para la cerveza, etc., bien en fresco o previamente desecada, como se dijo en el primer capítulo de este libro. Sobre ella se ha trabajado mucho y son muchísimos los procedimientos con prescripciones muy precisas para obtener productos muy puros. Allí mismo indicábamos el medio de que nos valíamos en el Instituto de Fisiología de la Universidad de Halle a. d. Saale, para obtener un líquido con propiedades invertínicas bastante enérgicas, aun cuando este líquido encierra además otra porción de fermentos, *polipeptidasas* y *zimasa*, etc. MICHAELIS, DAVIS, EULER, WILLSTÄTTER, etc., describen otros tantos procedimientos al detalle.

Maltasa. Se puede aislar también de la levadura, del maíz, etc., y se extrae mediante agua 132 cm.³ para 88 gr. de levadura lavada y prensada, se añade toluol y se agita, al principio la reacción es neutra, pero a las cinco o seis horas suele hacerse ácida y conviene mantenerla neutra añadiendo amoníaco con gran cuidado, quizá es más cómodo añadir carbonato de magnesio. Para una extracción de duración de seis horas, harían falta para las cantidades citadas 32,5 hasta 41,8 cm.³ al 1 % de amoníaco.

Zimasa. Se obtiene, como las anteriores, de la levadura, bien mediante la prensa de BUCHNER, o siguiendo el método de P. CARNOT, P. GERARD y F. RATHERY, lavando la levadura de cerveza tres o cuatro horas en agua fría y corriente, agitándola, dejándola reposar luego y decantando, y repitiendo esto mismo hasta que el agua de la decantación sea clara. Se prensa luego, se seca cuarenta y ocho horas a 25° a 30° y se pulveriza. El polvo conserva facultades fermentativas durante varios meses. Para utilizarlo como zimasa se frota en un mortero con tres veces de agua a 35° durante dos horas y se filtra.

Lipasa. Se puede obtener la del suero, de diferentes órganos, etc., por ejemplo, del páncreas mediante la glicerina concentrada añadiendo algo de CO_3Na_2 en la proporción de 1 cm.³ de solución al 1 % de él, para nueve partes de glicerina. Del hígado se puede extraer mediante el ClH al 1 %, pero al filtrar a través de papel se debilita mucho.

Esterasa. Se puede extraer del hígado de cerdo con agua a 37° durante un día y luego de varias semanas en ella, pero a la temperatura ordinaria del laboratorio, se limpia precipitándola con $SO_4(NH)_{42}$, filtrando y dializando el precipitado previamente disuelto en agua otra vez.

Nucleasa. Se puede obtener del páncreas frotándolo con arena, prensándolo con la prensa de BUCHNER, se satura el jugo con $SO_4(NH_4)_2$, el precipitado se lava y se seca con alcohol éter, conservándose en este estado largo tiempo, apto siempre para descomponer el ácido nucleínico.

Los fermentos oxidantes y reductores pueden extraerse de muchos vegetales, hongos, fanerogamas, etc., así la *lacasa* suele obtenerse del jugo de patatas y de coles; la tirosinasa de la « Vicia faba », de sus tallos y hojas; la *peroxidasa* de los berros; pero también se pueden utilizar órganos de animales, por ejemplo.

La catalasa. Suele obtenerse, triturando 50 gr. de hígado de ternera con arena de diatomaceas en un mortero, durante un cuarto de hora, se prensa y se desecha el jugo, lo prensado se lava con 30 cm.³ de agua agitándolo y se vuelve a prensar, y esto se repite otra vez. Los jugos obtenidos de las dos últimas prensaduras se reúnen y son la disolución madre de la catalasa que se conserva bien añadiéndole toluol, quizá se forme poco a poco un precipitado que se separa por filtración antes de utilizarlo. De esta solución se puede diluir hasta 1/50.000 en agua destilada, pero para seguir la descomposición del H_2O_2 (Perhydrol Merçk) hay que diluirlo al 1/1.000.

Emulsina y glicosidasa. Se puede obtener de huesos, de ciruelas, de almendras, etc., mediante el agua. Los primeros procedimientos citados por A. WOHLER, J. LIEBIG y ROBIQUET son los que hoy se usan poco modificados. Según BOURQUELOT y HERISSEN se les quita la corteza a las almendras dulces y se machacan, se maceran veinticuatro horas en agua semisaturada de cloroformo, se cuela, se acidifica con algo de ácido acético para separar la albúmina (caseína vegetal) y se precipita por fin con cuatro veces su volumen de alcohol. De las almendras puede obtenerse también la galactosidasa.

APÉNDICE II

Breve resumen sobre la composición química de los principios inmediatos de los organismos

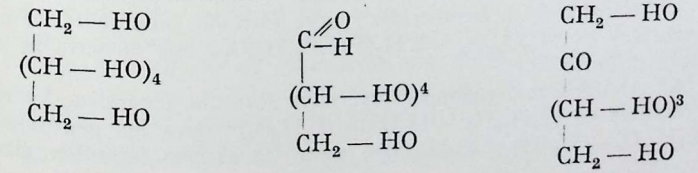
Con objeto de tener más a la mano las fórmulas y la estructura química de los grupos de los compuestos que se citan en esta obra, recordaremos brevemente lo más elemental de la química de los principios inmediatos de los organismos, que como se sabe, se clasifican en cuatro grupos, que son : 1.° *Hidratos de carbono*. 2.° *Grasas*. 3.° *Principios nitrogenados* que encierran los *albuminoides* y los productos de sus metamorfosis regresivas; y 4.° *Substancias minerales*. De este último grupo prescindiremos, por tratarse de substancias de composición conocida por la química inorgánica.

I. Hidratos de carbono

Se suelen estudiar los primeros no sólo por la sencillez de su composición elemental, sino por las condiciones de su génesis que representa el primer paso que da la vida en la elaboración de substancias orgánicas mediante sencillos compuestos minerales con el concurso de la energía física.

Se llaman hidratos de carbono, porque contienen el hidrógeno y el oxígeno en las proporciones precisas para formar agua, semejando la combinación de ésta con el carbono. Son substancias neutras cuya constitución química ha sido aclarada y ordenada sobre todo merced a los geniales trabajos de E. FISCHER.

1.° El grupo más sencillo lo componen los *hidratos de carbono no hidrolizables*, los cuales son *alcoholes poliatómicos* que poseen además la función *aldehídica* o la *acetónica*, a las cuales deben sus más relevantes caracteres. En atención a esta diferencia, se dividen en *aldosas* y *cetosas*, derivando unas y otras de alcoholes poliatómicos, por la producción correspondiente del grupo aldehídico o cetónico, como se ve a continuación :



Alcohol exatómico — Aldosa — Cetosa

Se dividen en *monosas*, *biosas*, *triosas*, etc., hasta *nonosas* inclusive según contengan 1, 2, 3, hasta 9 átomos de carbono, y al nombrarlas se antepone el prefijo aldo o ceto, según el grupo funcional que contengan. Las anteriormente formuladas se llamarán aldoexosas y cetoexosas. Presentan estos dos grupos, como se ve, una *isomeria funcional* y además tendrán la estereoquímica correspondiente a uno y otro grupo relacionadas con los átomos de carbono asimétrico. Si llamamos m al número de estos átomos, el de los estereoisómeros posibles N se expresa en la siguiente relación

$$N = 2^m$$

Como en las aldosas, los átomos de carbono asimétricos son todos menos dos, si llamamos n al número total de sus átomos de carbono, será $N = 2^{n-2}$. Como en las cetosas son todos asimétricos menos tres, el número de isómeros posibles $N = 2^{n-3}$. En el ejemplo anterior de las exosas serán, pues, posibles 16 aldosas y 8 cetosas, en junto 24 estereoisómeros incluídos en la fórmula $C_6H_{12}O_6$.

2.° Los demás hidratos de carbono son hidrolizables, es decir, capaces de ser descompuestos en otros más elementales mediante la adición de H_2O. Nos encontramos entre ellos los que resultan de la condensación de *dos* o de *tres* moléculas de los anteriores, según sean las *glucobiosas* o *disacáridos*, o las *glucotriosas* o *trisacáridos* con separación de *una* o de *dos* moléculas de agua respectivamente. Las moléculas generadoras se articulan entre sí por los grupos alcohólicos o por los aldehídicos, o los acetónicos. Así que los cuerpos así constituídos además de las funciones alcohólicas persistentes, poseerán la de *eteróxido* o la de *acetal*.

3.° Por último se pueden condensar n moléculas de hidratos de carbono con separación de n moléculas de H_2O resultando unos cuerpos llamados *anhidrosas* o *polisacáridos* de constitución obscura en los cuales sólo se advierte la persistencia de la función alcohólica.

El cuadro de los hidratos de carbono según su complicación progresiva, resultará así:

1.° *Glucomonosas* o *monosacáridos* que encierran las monosas CH_2O, diosas $C_2H_4O_2$, triosas $C_3H_6O_3$, tetrosas $C_4H_8O_4$, pentosas $C_5H_{10}O_5$, exosas $C_6H_{12}O_6$, eptosas $C_7H_{14}O_7$, octosas $C_8H_{16}O_8$, nonosas $C_9H_{18}O_9$.

2.° *Glucobiosas* o *disacáridos*: cuya fórmula general de los más interesantes es $2\,C_6H_{12}O_6 - H_2O = C_{12}H_{22}O_{11}$ que encierra la maltosa, isomaltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa.

3.° *Glucotriosas* o *trisacáridos*: cuya fórmula general de los más importantes es $3\,C_6H_{12}O_6 - 2\,H_2O = C_{18}H_{32}O_{16}$, que encierra la melezitosa rafinosa.

4.° *Anhidrosas* o *polisacáridos*: cuya fórmula general de los más interesantes es $(C_5H_{10}O_5 - H_2O) = (C_5H_8O_4)^n$ para las pentosanas; y $(C_6H_{12}O_6 - H_2O)^n = (C_6H_{10}O_5)^n$ para las exanas (almidón, glucógeno, etc.).

Sabemos que las *exosas*, entre los *monosacáridos*, encierran tres azúcares muy importantes entre sus 24 estereoisómeros posibles. Tales son la *glucosa*, llamada azúcar de uva, que se presenta también en la orina de los diabéticos, que es directamente fermentescible y por su función aldehídica es reductora (reacción con el licor de FEHLING). La *d. galactosa* interesante por ser producto de la hidrólisis del disacárido lactosa, y la *fructosa* o *levulosa* que es levógira, se la llama también azúcar de frutos y aparece como producto de la hidrólisis de la inulina y de la sacarosa.

Entre las *glucobiosas* o *disacáridos* debemos citar sobre todo la *maltosa*, formada por la asociación de dos moléculas de glucosa. Procede de la hidrólisis de la fécula por la acción de la malta, o sea de la cebada en germinación. La *lactosa* o azúcar de leche, que corresponde a la condensación de una molécula de glucosa y de otra de galactosa, en las que se desdobla por hidrólisis, y la *sacarosa* o azúcar de caña o de remolacha. Es dextrógira pero al hidrolizarse origina glucosa y levulosa cuya mezcla resulta levógira, constituyendo lo que se llama *azúcar invertido*, y a aquella hidrólisis *inversión del azúcar*.

Del grupo de las *exanas* entre los *polisacáridos* debemos citar el *almidón*, *glucógeno*, *inulina*, *celulosa*, *fécula*. Por hidrólisis sabemos que la fécula o el almidón, pasan a almidón soluble, éste a dextrinas diversas, luego a maltosa y por fin a glucosa.

Respecto al origen de los hidratos de carbono se admite como la más probable, la vieja teoría de BAYER, que dice que las plantas que como sabemos absorben el C del CO_2 de la atmósfera desprendiendo el O mediante la función clorofiliana, originan en seguida el aldehido fórmico, base de todos ellos, según la ecuación

$$CO_2 + H_2O = CH_2O + O_2$$

viene en seguida la polimerización de este aldehido así

$$12\,CH_2O = C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$$

(aldehido fórmico) = (Sacarosa) + (agua)

y luego

$$n\,C_{12}H_{22}O_{11} = n\,H_2O + 2\,(C_6H_{10}O_5)^n$$

n sacarosa = n agua + 2 Féculas o exanas

Los grupos más inferiores son cristaloides y solubles en el agua; por eso son mejor conocidos en su composición química; los superiores, como el almidón, celulosa, etc., se presentan en estado coloidal (eucoloides de OSTWALD) y su limpieza y caracterización química presenta todas las dificultades de los cuerpos que no se pueden obtener cristalizados; por eso su estructura química nos es menos conocida. Las dextrinas son el tránsito entre ambos términos, tanto químicamente como respecto a su estado.

II. Grasas

Las combinaciones de los alcoholes y los ácidos con separación de agua forman los ésteres, siendo los ésteres naturales más importantes indudablemente, las grasas. Estas son, pues, ésteres naturales del alcohol denominado glicerina

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} \quad \text{ó} \quad C_3H_5\begin{matrix}\diagup OH \\ -OH \\ \diagdown OH\end{matrix}$$

con los ácidos grasos, que como son en gran número, originarán numerosas especies químicas. Las grasas, además, no están formadas por un solo éter glicérico sino por la mezcla de varios, siendo los más importantes la palmitina, estearina y oleina cuyas respectivas fórmulas son

$$C_3H_5\begin{matrix}\diagup (C_{16}H_{31}O)O \\ -(C_{16}H_{31}O)O \\ \diagdown (C_{16}H_{31}O)O\end{matrix}$$
Palmitina

$$C_3H_5\begin{matrix}\diagup (C_{18}H_{35}O)O \\ -(C_{18}H_{35}O)O \\ \diagdown (C_{18}H_{35}O)O\end{matrix}$$
Estearina

$$C_3H_5\begin{matrix}\diagup (C_{18}H_{33}O)O \\ -(C_{18}H_{33}O)O \\ \diagdown (C_{18}H_{33}O)O\end{matrix}$$
Oleina

Las grasas son blancas, inodoras, insípidas, más ligeras que el agua, líquidas o sólidas, y éstas fusibles a temperatura poco elevada, insolubles en el agua, solubles en el éter, en el cloroformo, en el sulfuro de carbono y en los aceites esenciales.

Por hidrólisis se descomponen en el alcohol glicérico y en los ácidos que lo eterifican

$$C_3H_5(C_{16}H_{31}O)^3 + 3\ H_2O = C_3H_5(HO)_3 + 3\ C_{16}H_{32}O_2$$
(Palmitina) + (agua) = (Glicerina) + (ác. palmítico)

Estas hidrólisis pueden realizarla los álcalis, los ácidos, el agua a temperatura superior a 100° y los fermentos.

Proceden en los organismos de tres orígenes:

1.° De las ingeridas en la alimentación, que el organismo las transforma para convertirlas en las que le son propias.

2.° De los hidratos de carbono, siendo reducidos por efecto de un considerable desprendimiento de gas carbónico

$$13\ (C_6H_{12}O_6) = C_3H_5\begin{matrix}\diagup (C_{16}H_{31}O)O \\ -(C_{18}H_{35}O)O \\ \diagdown (C_{18}H_{33}O)O\end{matrix} + 23\ CO_2 + 26\ H_2O$$
(Glucosa) (Palmito-estearo-oleina)

3.° De los albuminoides, de los cuales también por reducción consecutiva a la separación de cuerpos muy oxidados se originan las grasas.

$$4\ C_{72}H_{112}N_{18}SO_{22} + 68\ H_2O$$
(Albúmina) + (agua)

$$= 36\ CO(NH_2)_2 + 3\ C_3H_5\begin{matrix}\diagup (C_{17}H_{33}O)O \\ -(C_{18}H_{35}O)O \\ \diagdown (C_{18}H_{33}O)O\end{matrix}$$
Urea + Margaro-estearo-oleina

$$+ 12\ C_6H_{10}O_5 - 14\ SO_4H_2 + 15\ CO_2$$
+ Glucógeno, etc.

Como los hidratos de carbono contienen aproximadamente 50 % de O, los albuminoides 24 % y las grasas 10 %, al producirse las últimas a expensas de los dos primeros tendrá que desprenderse el exceso de O. De tal modo que los animales que almacenan grasas a expensas de aquéllos desprenden en la respiración mayor volumen de CO_2 que el correspondiente al del oxígeno inspirado. La relación $\frac{CO_2}{O_2}$ se llama *cociente respiratorio;* en el caso de producirse reserva de grasas su valor es superior a la unidad por el aumento del numerador.

A las grasas se suele asimilar las lecitinas, protagon, etc., pero de la constitución de aquéllas ya nos ocupamos al hablar de la química coloidal de los lipoides.

III. Albuminoides

En el capítulo correspondiente a la química coloidal de los albuminoides, hablábamos algo de la composición química de estos compuestos y dábamos su clasificación en grupos. Ahora, pues, parece oportuno detenerse en el estudio de las *piedras de construcción* de los mismos (bausteine) de los alemanes, que son los *amino-ácidos*, y de sus combinaciones que son los *polipéptidos*.

Como por otra parte, no hay como la práctica para darse cuenta de muchas de estas cuestiones, en defecto de ella, creo que será muy útil la descripción de una experiencia cualquiera. Por conocerlo mejor se detallará un trabajo que realizó el autor mismo, por indicación de ABDERHALDEN, cuando acudía a su laboratorio en el Instituto de Fisiología de Halle a. d. Saale. A continuación se tratará brevemente de los polipéptidos.

Amino-ácidos y polipéptidos

Como hemos dicho, son los amino-ácidos las piedras de construcción de los albuminoides. Los obtenemos cuando descomponemos las grandes moléculas albuminoideas. Si sometemos la seda, la fibrina u otra substancia nitrogenada orgánica cualquiera a la ebullición prolongada en un ácido, sea el clorhídrico, logramos este dislocamiento

de las grandes moléculas nitrogenadas en otras mucho más sencillas. De éstas por su insolubilidad se conocían de antiguo algunas como la leucina, tirosina, etc. Pero quedaba un producto obscuro cuya composición era desconocida porque no podían aislar sus componentes. El genio de E. Fischer descubrió el medio de separarlos. Disolvía el producto de la hidrólisis en el alcohol y hacía pasar a su través ácido clorhídrico gaseoso hasta la saturación, así se formaban los ésteres clorhídricos de los amino-ácidos allí contenidos. Ya en esta forma se dejan separar fácilmente por destilación fraccionada. Una vez aislados se logra con una base como la sosa, separar el ácido clorhídrico quedando combinados el alcohol y el amino-ácido, luego mediante la saponificación separaba ambos y obtenía cristalizado el último. El y sus discípulos lograron obtener, analizar y conocer en su estructura hasta 19 amino-ácidos, como la glicocola, alanina, leucina, etc. Se llaman así porque encierran el grupo COOH, es decir, el grupo funcional ácido de la química orgánica y además el grupo NH_2 amina. Así la alanina derivada del tercer ácido graso, el ácido propiónico $CH_3 - CH_2 - COOH$ tiene por fórmula $CH_3 - CHNH_2 - COOH$, se llamará, pues, ácido α amino propiónico. La colocación del grupo NH_2 substituyendo un H del lugar α que es siempre el del carbono inmediato al grupo último COOH de la cadena que forma el ácido y es un carácter de todos los amino-ácidos. Todos son, por lo tanto, ácido α amino, etc. Todos menos la glicocola tienen un carbono asimétrico (1), lo cual quiere decir que todos menos la glicocola son racémicos. Se dice que un cuerpo es racémico, cuando no tiene acción sobre la luz polarizada, por estar formado por dos mitades, de acción opuesta sobre aquella luz. Estas dos mitades, la una *d*, dextrógira y la otra *l*, levógira, pueden separarse por los medios que luego indicaremos, y conocido el poder de desviación sobre la luz polarizada de una mitad, se conoce el de la otra que tiene que ser igual pero de signo contrario. También es igual la fórmula bruta de ambas, sólo se diferencian en la disposición de los grupos alrededor del C asimétrico. Son los que se llaman los dos isómeros óptico-activos que reunidos forman el racémico de acción nula en el polarímetro.

Polipéptidos. Por procedimientos, que luego detallaremos, logró Fischer copular moléculas de amino-ácidos entre sí formando los dipéptidos, tripéptidos, etc., y en general los polipéptidos. Así, dos moléculas de glicocola o glicina se unen para formar la glicil-glicina $CH_2NH_2 - CONH - COOH$. Esta unión por los grupos COOH y NH_2 es también constante en todas las uniones sin excepción de los

(1) Se dice que un carbono es asimétrico cuando sus cuatro valencias están saturadas de distinto modo; así, el segundo C de la alanina se puede escribir así

$$CH_3 - \overset{\overset{H}{|}}{\underset{\underset{NH_2}{|}}{C}} - COOH$$

y es, por lo tanto, asimétrico. En la glicocola $CH_2NH_2 - COOH$ se ve que no hay ninguno.

amino-ácidos para formar los polipéptidos, podemos representarla por este esquema (X representa un radical diferente según el amino-ácido)

$$X - NH_2 \quad + X - NH_2 \quad + X - NH_2 \quad \text{pasa}$$
$$\diagdown COOH \qquad \diagdown COOH \qquad \diagdown COOH$$

a

$$X - NH_2 \quad X - NH \quad X - NH \quad + 2\,H_2O,$$
$$\diagdown CO \diagup \diagdown CO \diagup \diagdown COOH$$

vemos en este ejemplo que la síntesis se verifica con desprendimiento de dos moléculas de agua. El proceso inverso denominado *hidrólisis* consistirá en la descomposición del tripéptido en sus amino-ácidos, previa incorporación de dos moléculas de agua. Esto se consigue por la acción en caliente de ácidos, como acabamos de describir, o por la acción de fermentos, como indicamos muy a menudo en el curso de este trabajo.

E. Fischer logró reunir 18 moléculas, 15 de glicocola y 3 de leucina, con un peso molecular = 1213. Las grandes moléculas grasas como la triestearina pesan menos, ésta sólo 891. Posteriormente, Abderhalden y Fodor reunieron 19 moléculas de amino-ácidos para formar la molécula sintética de mayor peso que se ha logrado hasta hoy. Este polipéptido se denomina L . leucil-triglicil- l . leucil-triglicil-l . leucil-triglicil-l . leucil-pentaglicil-glicina. Nótese que escogieron aquí la L . leucina y no la D. L. leucina o racémica con el objeto de imitar en lo posible a la Naturaleza, en donde, como dijmos, sólo se encuentran los ópticos activos, en este caso el levógiro L. Los racémicos son los productos de síntesis en los laboratorios.

Trataban de ver si con un tamaño molecular tan gigantesco se pasaba los límites asignados a las partículas que caracterizan lo que en la química coloidal se llaman dispersiones moleculares y se consigue obtener una molécula ya colcidal, albumincidea, visible al ultramicroscopio, etc., pero nada de esto se logró. Hay que tener en cuenta que por grande que nos parezca el polipéptido citado, dista mucho de llegar a los pesos moleculares asignados, según Holleman, a la gelatina = 3.600, y a la albúmina de la clara de huevo que alcanza el enorme de 11.000. El coste de tales polipéptidos es grande y su síntesis se hizo por esta razón después de la guerra completamente irrealizable. Además, para añadir una molécula más a la cadena, se necesita realizar una serie de operaciones, que describimos brevemente al tratar de nuestra experiencia, y que requieren por lo menos tres semanas. Como quiera que los polipéptidos se forman añadiendo molécula tras molécula, pues no se ha logrado reunir dos cadenas ya largas, por ejemplo, un pentapéptido con un tetrapéptido, resulta que para obtener 10 ó 12 gramos del citado se necesitaría quizá un año de trabajo constante. Para obtener yo la combinación, nueva hasta entonces, glicil-d-leucil-glicina necesité de dos a tres meses. Damos estos detalles para indicar la razón del porqué no se trabaja mucho más con ellos en estudios de fermentaciones, a pesar de que no hay quizá material más apropiado para ello. Pues permiten, como ningún otro compuesto, estudiar su cinética, diferenciar fermentos viendo si uno rompe

la cadena en un sitio o en otro, si atacan tal óptico activo o no, si el ataque de un fermento y la resistencia a él de un polipéptido están condicionados por la presencia al principio, fin o centro de la cadena de tal o cual amino-ácido, etc., y resolver tantos otros problemas de que se habla en el capítulo segundo. Para terminar estas brevísimas líneas sobre estructura de albuminoides, diremos que continúa hoy especialmente los trabajos de E. FISCHER su discípulo predilecto E. ABDERHALDEN, el cual trata de realizar la descomposición de aquéllos más suavemente, paso a paso, procurando obtener no ya los amino-ácidos separados entre sí, sino productos intermediarios puros y aclarar su estructura, habiendo conseguido aislar y descubrir anhídridos en cuya composición entran más de dos amino-ácidos.

Estudio comparativo de un tripéptido óptico activo obtenido una vez por fermentación y otra por síntesis. En este caso, como en otros muchos sobre polipéptidos, se trataba de obtener una combinación nueva entre las muchas posibles, aquí era la *glicil-D. L. leucil-glicina*, ver si era atacada por la polipeptidasa, estudiar el producto que resta tras el ataque que aquí resultó ser el tripéptido óptico activo *glicil-D. leucil-glicina*, estudiar sus constantes físicas y compararlas con las del mismo compuesto óptico-activo obtenido por síntesis.

El resumen de las operaciones es el siguiente:

1.° **Síntesis del tripéptido.** Tenemos que juntar una molécula de leucina con una de *glicocola*.

Se obtiene por síntesis o se compra *leucina* racémica que es la que circula en el comercio, y como no es copulable con una molécula de glicocola, hay que transformarla sustituyendo los grupos NH_2 y OH de su fórmula por un halógeno, sea el Cl ó el Br [1] como la leucina, según se ve en la fórmula, es el ácido α aminoiso-caprónico, el derivado bromado se llamará bromuro de bromoisocapronilo (siempre el compuesto racémico d. l.)

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot COOH$$

Acido α aminoiso caprónico o leucina

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH(Br)\cdot CO\cdot Br$$

Bromuro de bromoisocapronilo

Este derivado ya es copulable con la glicocola, basta agitarlos juntos en las proporciones debidas en solución alcalina, y en un frasco rodeado de una mezcla frigorífica y se obtiene el compuesto dl. α bromisocapronil-glicina.

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH(Br)\cdot CO\cdot Br + NH_2\cdot CH_2\cdot COOH =$$

Bromuro de bromoisocapronilo + Glicocola o glicina =

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH\cdot(Br)\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH + HBr$$

Bromisocapronilglicina + Ácido bromhídrico

(1) Los detalles para realizar estas operaciones y todas las que citemos están minuciosamente descritos en los trabajos originales de E. FISCHER y recopilados en el *Physiologisches Praktikum*, de E. ABDERHALDEN. J. Springer, Berlín.

Se sustituye el Br de éste por el NH_2 dejándolo tres días a 37° en presencia de NH_4 y se obtiene ya la *glicil D. L. leucina*.

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH(Br)\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH + 2\,NH_3 =$$

Bromisocapronilglicina + Amoníaco =

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH + NH_4Br$$

Leucil-glicina + Bromuro amónico

hay que unirle ahora una molécula de glicocola. Como ésta no es copulable se la transforma, como en el caso anterior, en su compuesto halogenado sustituyendo los grupos NH_2 y OH por el Cl ó Br. Como la glicocola es el ácido amino-acético, según se ve en la fórmula, su derivado clorado será el cloruro de cloroacetilo.

$NH_2\cdot CH_2\cdot COOH$ — Glicocola o Glicina

$CL\cdot CH_2 - CO\cdot CL$ — Cloruro de cloroacetilo

Este se copula, como dijimos antes, agitándolo con el dipéptido obtenido y se obtendrá primero el compuesto cloruro de acetilo dl. leucil glicina y aminando éste, es decir, sustituyendo el Cl por el NH_2 se obtendrá la *glicil. d. l. leucil. glicina*

$$NH_2\cdot CH_2 - CO - NH\cdot CH\cdot CO\cdot NHCH_2 - COOH$$

$$\begin{matrix}|\\CH_2\\|\\CH\end{matrix}$$

$$\begin{matrix}CH_3 & CH_3\end{matrix}$$

Glicil — Leucil — Glicina

2.° **Descomposición de este tripéptido por fermentos.** Lo primero que hay que ver es si es atacable por ellos, utilizamos la polipeptidasa contenida en el jugo de la levadura obtenido como se indica en este mismo libro, capítulo I, y se preparan dos soluciones en dos frascos de ERLENMEYER.

1.ª *Solución prueba*	2.ª *Solución control*
5 c. c. de sol. del tripéptido al 5 %.	11 c. c. de agua destilada
6 c. c. de gua destilada.	Solución de NaOH n/10 hasta reacción débilmente alcalina.
Solución de NaOH n/10 hasta reacción débilmente alcalina.	2 c. c. de jugo de levadura.
2 c. c. de jugo de levadura.	

Colocadas ambas en la estufa a 37°, se toman del control y de la prueba cuatro tomas de cada uno y de 3 c. c. todas ellas. Estas cuatro tomas se hacen en cuatro veces sucesivas separadas por intervalo de diez minutos. El análisis del N amínico, es decir, del grupo NH_2, realizado según el método de SORENSEN, reveló una variación en las diferentes

tomas de la solución prueba y no en las de la solución control que, como se ve, no tenía tripéptido (lo cual se advierte en el cuadro adjunto, fig. 67). De esto dedujimos que en efecto el fermento atacaba a aquél. Con este dato nos propusimos estudiar el producto del ataque. Colocamos en un frasco, como el de la figura 68, una disolución en agua del tripéptido y se le añade levadura y azúcar, éste para que viva mejor el sacaromices. Las proporciones están bien estudiadas por FELIX EHRLICH y se pueden encontrar en el mismo *Praktikum* de ABDERHALDEN. Se deja todo a 37° dos o tres días, hasta que el líquido después de hervido dé FEHLING negativo, señal de que toda la sacarosa estaba consumida. Como se ve, además que la levadura ha muerto, pues yace en el fondo del frasco y no hay desprendimiento de burbujas,

	Cantidades utilizadas de		Cálculo del Nitrógeno amínico
	NaOH 1/5 N.	ClH 1/5 N.	
Prueba I	2,1 c^3	0	2,1 × 2,08 = 4,368 mg.
Control I	0,5 c^3	0	0,5 × 2,08 = 1,4 mg.
Prueba II	2,4 c^3	0	2,4 × 2,08 = 4,992 mg.
Control II	0,5 c^3	0	0,5 × 2,08 = 1,4 mg.
Prueba III	2,7 c^3	0,2	2,5 × 2,08 = 5,2 mg.
Control III	0,5 c^3	0	0,5 × 2,08 = 1,4 mg
Prueba IV	2,5 c^3	0,1	2,4 × 2,08 = 4,992 mg.
Control IV	0,5 c^3	0	0,5 × 2,08 = 1,4 mg.

FIG. 67

Cada prueba o control se hizo con 3 cm.³ de los líquidos indicados en el texto. El nitrógeno amínico del control, que como se indica no tenía tripéptido, procede de los albuminoides existentes en el jugo de levadura. Para explicar el descenso del N amínico de la Prueba IV, ver pág. 165, parte dedicada a *Fermentos*, de esta obra

es de suponer que habrá ya consumido toda la parte del tripéptido que ella puede utilizar para su alimentación, no hay ya más que aislar lo que quede, obtenerlo cristalizado y analizarlo, habiendo resultado ser el tripéptido óptico activo glicil D. leucil-glicina. La levadura «comió», pues, el otro isómero óptico activo y no atacó éste. Se estudian sus constantes físicas, punto de fusión, poder rotatorio, etc., para compararlos con el sintético.

Debemos advertir que no añadimos a la solución a fermentar la mezcla reguladora de fosfatos, de los H iones, porque no se trata de conservar las mismas condiciones durante todo el proceso, no es un estudio de cinética, sino de química de la fermentación solamente.

El objeto de la disposición del frasco dibujado para la fermentación es que al desprenderse gases, salgan por el tubito *a*, cuyo extremo está sumergido en el agua del de ensayo *b*, y así se formen burbujas claramente visibles (fig. 69).

3.° **Síntesis de la glicil d-leucil-glicina.** — Hemos dicho que sintéticamente sólo podemos obtener dl. leucina y ahora nos hace falta

d. leucina. Para ello E. FISCHER formilaba los amino-ácidos racémicos y los trataba por el alcaloide *brucina*, formándose una sal de cuyas dos mitades ópticas, una es soluble en alcohol a 0° y la otra no. Se obtiene en nuestro caso la sal *brucina* de la formil d. leucina, separamos uno de los componentes ópticos, el que nos conviene, lo libertamos del radical formílico y de la brucina y una vez obtenida la d. leucina (1) no hay más que copularla primero con la glicocola, y el dipéptido formado otra vez con la glicocola, del modo descrito anteriormente, y se obtiene sintéticamente la glicil d. leucil-glicina. Cerciorados por el análisis de que está bien limpia, se estudian sus constantes físicas y se comparan con los valores de ellas obtenidos para el mismo tripéptido obtenido por fermentación.

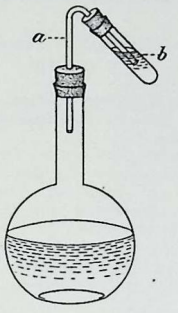


FIG. 68

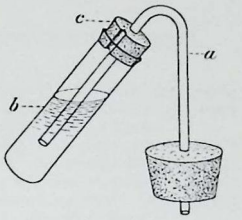


FIG. 69

El tapón c lleva una muesca para permitir la salida de los gases que tiendan a salir del frasco por el tubo *a*

Hemos insistido en detalles químicos y escrito algunas fórmulas porque el procedimiento para sintetizar amino-ácidos y formar las grandes cadenas de polipéptidos tan útiles en estudios fermentativos es siempre el mismo. Se comienza siempre por sustituir los grupos NH_2 y OH de cualquiera de los 19 amino-ácidos por el Cl ó Br, entonces se copula con otra molécula de otro amino-ácido o de sí mismo, se amina después, se obtiene un dipéptido, del mismo modo se añade otra molécula y obtiene un tripéptido-tetrapéptido, etc. Para detalles, los dos libros citados y el de A. FODOR, *Nachweis, Bestimmung und Synthese der Monoaminosäuren* en la colección *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* de E. ABDERHALDEN (2).

(1) Téngase en cuenta que al pasar ésta al bromuro de bromoisocapronilo cambia de signo, se hace D. que es lo que nos conviene. Esta transformación se denomina de *Walden*.

(2) Como resultados prácticos de este trabajo pueden citarse, resumiendo:

1.° La obtención del tripéptido racémico nuevo glicil-leucil-glicina cuyo punto de fusión es 210°.

2.° La demostración de que éste es atacable por la polipeptidasa del sacaromices.

3.° La descomposición por medios químicos del anterior y obtención del glicil d-leucil glicin (poder rotatorio + 16,6).

4.° Los fermentos al descomponer aquél dejan la glicil d. leucil-glicina, con gran probabilidad, aunque la escasa cantidad obtenida de él impidieron dar con seguridad sus constantes físicas.

BIBLIOGRAFÍA [1]

Lista de tratados modernos importantes sobre la cuestión de los fermentos en general

1896. Arthus, M., *Nature des Enzymes* (Thèse). Henri Jouve. París.
1901. Reynolds Green, *Die Enzyme* (traducción al alemán de Wilhelm Windisch). Paul Parey. Berlín.
1903. V. Fleuri, *Lois générales de l'action des Diastases* (Thèse). Hermann. París.
1910. W. M. Bayliss, *Das Wesen der Enzym-wirkung* (traducción del original inglés al alemán por Karl Schorr). Theodor Steinkopff. Dresde-Leipzig.
1913. Carl Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, 4.ª ed. F. C. W. Vogel. Leipzig. Está apareciendo la 5.ª edición completamente modificada, con un capítulo especial de R. Kuhn, sobre Físico-química y Cinética. Van publicadas ya las entregas 1-5 del tomo I.
1914. J. Effront, *Les catalysateurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie*. Tl. Dinod e E. Pinat. París.
1917. Antonio de Gregorio Rocasolano, *Estudios químico-físicos sobre la materia viva*. 2.ª ed. Zaragoza.
1918. P. Eduardo Vitoria, *La Catálisis química*, 2.ª ed. (Barcelona, Tipografía Católica, calle Caspe).
1920. R. Turró, *Los fermentos defensivos en la inmunidad natural y adquirida*. Calpe. Madrid. 2.ª ed.
1922. Svante Arrhenius, *Die Chemie und das moderne Leben*. (Ak. Verl., Leipzig). Carracido, *Química biológica*.
1922. Andor Fodor, *Das Fermentsproblem*. Theodor Steinkopff. Dresde-Leipzig.
1920-1923. Hans Euler, *Chemie der Enzyme*, 3 tomos. J. F. Bergmann. Wiesbaden. (2.ª edición completamente modificada según lecciones explicadas en sueco por el autor en la Universidad de Estocolmo).
1923. E. Abderhalden, *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, 2.ª parte (páginas 260-400). 5.ª ed.
1924. Herbert Freundlich, *Grundzüge der Kolloidlehre*. (Ak. Verl., Leipzig).
1926. P. Rona, *Praktikum der Physiologischen Chemie*. Parte I, *Ferment-methoden*. Berlín (331 págs. con 73 figuras).
1926. Ernst Joel, *Das Kolloide-Gold in Biologie und Medizin (Die Goldsolreaktion im Liquor cerebroespinales)*. (Akademische Verlagsgesellschaft). Leipzig.
1926. H. R. Kruyt, *Einführung in die physikalische Chemie und Kolloidchemie (insbesondere für Biologen und Mediziner)*, traducido del holandés al alemán por el Dr. A. Nowak (Akademische Verlagsgesellschaft). Leipzig.
1926. The Svedberg, *Kolloid-Chemie*, traducido del sueco al alemán por el Dr. Finkelstein (Akademische Verlagsgesellschaft). Leipzig.

(1) En el curso de nuestro trabajo también hacemos indicaciones bibliográficas sobre asuntos que así lo requieren.

Índice alfabético de autores

Abderhalden, 79, 107, 159, 168, 179, 181, 193, 194, 204, 209 y ss., 215 y ss., 226, 234 y ss., 245, 251 y ss., 257, 259, 267, 269, 270, 273.
Abbé, 25.
Agazotti, 188.
Armstrong, 217.
Arthus, 214.
Arrhenius, 34, 42, 54, 105.
Avogadro, 27, 39, 40, 41.

Bach, 236, 238.
Bachmann, 73.
Bang, 229,
Barendrecht, 214.
Batelli, 245 247.
Bayer, 265.
Bayliss, 158, 174, 178, 180, 186, 188, 190, 197, 199, 201, 205 y ss., 214, 229, 238.
Bearn, 210.
Bechhold, 62, 105 y ss.
Beijerinck, 79.
van Bemmelen, 74.
Berneck, 183.
Berthollets, 175.
Bertrand, 206, 238, 241, 242, 243.
Berzelius, 172 y ss.
Beutner, 60, 98.
Bierry, 206.
Bloch, 253.
Blumenthal, 254, 259.
Bois-Reymond Du, 58.
Bondenstein, 189.
Bordet, 105.
Bourquelot, 262.
Boyle, 39.
Bredig, 18, 173, 174, 184, 189, 190, 191, 195.
Brown, 27.
Brunner, 228.
Buchner, 161, 234, 243, 262.
Bunsen, 15.
Burr, 108.
Butschli, 72, 81.

Cañizaro, 240.
Carey Lea, 18.
Carlysle, 31.
Carnot, 261.
Chodat, 236, 238.
Clausius, 32 y ss.
Coehn, 55, 57.
Cohnheim, 260.
Collander, 131.
Cotton, 24.
Cramer, 210.
Cremer, 59.
Croft Hills, 166.

Danilewsky, 260.
Dastre, 207.
Davis, 261.
Davy, 31, 171.
Debye, 29, 73.
Donnan, 31, 42, 44, 48, 49, 70, 114, 129.
Doppelschicht, 55.
Dubois, 242.
Duin, 103.

Edkins, 204.
Effront, 162.
Ehrlich, 126, 209, 210, 272.
Einstein, Alberto, 27.
Embden, 248, 255.
Engler, 104.
Erlenmeyer, 15.
Euler, 163, 211, 261.
Evans, 108.

Faraday, 8, 15, 21, 31, 32, 53 y ss.
Fehling, 165.
Feigl, 104.
Fischer, 67, 70, 83, 85, 86, 117, 192, 193, 218, 263, 268, y ss., 273.
Fletchter, 247.
Fodor, 191, 197, 215, 234, 273.
Fourneau, 127.
Fränkel, Sigmund, 162, 259, 260.
Freundlich, 48, 57, 97 y ss., 188, 189, 200.
Friedberg, 259.
Frisch, 69.
Funk, 107.

Galvani, 58.
Gärtner, 260.
Gay-Lussac, 39 y ss.
Gerard, 261.

Giaja, 206.
Gibbs, 92, 99, 101.
Gibbs-Thomson, 129.
Gijón, 181.
Glaessner, 204.
Goldschmidt, 250.
Gowland, 107.
Grafen, 49.
Graham, Tomás, 3, 4, 6, 68.
Grotthuss, 32.
Grove, 32, 34.
Grubber, 105.
Guldber, 176.

Haber, 59.
Hamburg, 162.
Hamburger, 193.
Hamill, 207, 208.
Hams Münden, 79.
Hammarsten, 226, 229, 254.
Hantzsch, 137.
Hardy, 117, 119.
Harkins, 100, 103.
Hasselt, 259.
Hauy, 23.
Hedin, 207, 208.
Heinrich Danniel, 42.
Helmholtz, 55.
Henri, 206.
Herbst, 82, 128.
d'Herelle, 29.
Herissen, 262.
Hermann, 59, 247.
Hertwig, 128.
Hevesy, 57.
Hill, 248.
Hirsch, 168.
Hittorf, 33.
Höber, Rudolf, 125, 175, 180.
van't Hoff, 33, 34, 36, 199.
Hoffmeister, 71, 77, 113, 117, 121, 126.
Holleman, 269.
Hopkins, 107, 247.
Hulett, 44.

Inickoff, 229.

Jaffe, 55, 254.
De Jager, 214.
Jastrowitz, 254.

Kahho, 130.
Kahn, 256.
Kanitz, 200.
Kee, 256.
Kirchhoff, 171.
Klug, 208.
Kobert, 190.
Kohlrausch, 33, 34.
Korschum, 209.
Kossel, 254.
Krauss, 105.
Kruyn, 103.
Kühne, 159, 246.
Kullgren, 182.
Kumbler, 79.

Landstenier, 105, 106.
Langley, 204.
Langmuir, 100 y ss., 201.
Laue, 23, 29.
Leduc, 80.
Legendre, 133.
Lehmann, 26.
Lepeschkin, 120, 125.
Liebig, 172, 214, 262.
Liesegang, 69.
Lillie, 113, 114.
Lintner, 261.
Loeb, 48, 60, 70, 81, 99, 103, 110, 114, 117, 128.
Lottermoser, 53.
Luther, 149, 169.
Luzzatto, 254.

Madsen, 105.
Magnus, 198.
Mansfield Clark, 141, 150.
Mariotte, 39.
Mas y Guindal, Joaquín, 107.
Mastic, 28.
Maxwell, 88.
Meinicke, 105.
Mett, 167.
Meyerhof, 188, 199, 247, y ss.
Michaelis, 38, 50, 90, 99, 131, 141, 149, 167, 190, 214, 261.
Mitscherlich, 172.
Mohr, 84.
Mouton, 24, 114.
Mur, Jaime, 141.

Nägeli, 214.
Nathansohn, 128, 129.
Nernst, 36, 37, 55, 56, 59, 147, 176.
Neuberg, 225, 232, 254.
Nicholson, 31.
Nolan, 256.
Nothrop, 201.

Ostwald, 3, 5, 9, 14, 15, 18, 22, 23, 53, 55, 59, 64 y ss., 68, 71, 79, 81, 83, 84, 92, 95, 107, 110, 117, 137, 149, 169, 172, 183, 184, 238, 265.
Overton, 125 y ss., 128.

Paal, 78, 173.
Pascal, 28.
Pasteur, 172, 192.
Pauli, 77, 113, 117.
Pechstein, 190.
Perrin, 28.
Pfeffer, 33, 34, 38 y ss., 43.
Phillips, 171 172.
Pottevin, 200.
Procter, 115.

Quincke, 72.

Ramsay, 38, 43.
Ramson, 128.
Raoult, 34, 42.
Rathery, 261.

Richter, 3, 15.
Robiquet, 262.
Rocasolano, 231.
Rona, 50, 90, 99, 167, 179, 213, 353.
Röntgen, 73.
Rosenfeld, 254.
Rosenthal, 214.
Ruhland, 129.

Sabatier, 173, 185.
Sachs Georgi, 105.
Salkowski, 254.
Schade, 69, 106, 149.
Scherrer, 29, 73.
Schultz, 186.
Schütz-Boristow, 187.
Selmi, F., 3.
Siedentoff, 25.
Smoluchowski, 27.
Sorensen, 49, 113, 117, 141, 149, 165, 271.
Spek, 81, 82.
Spiro, 117, 126.
Spring, 24.
Staehelin, 84.
Starling, 205, 229.
Steibel, 219.
Stern, 245, 247.
Steenboch, 108.
Stock, 189.
Stoffel, 69.
Stokes, 28.
Susaeta, 133.
Swedberg, 18, 28.

Thomson, 92.
Traube, 38, 88, 106, 128, 129, 133.
Turró, 257, 258.
Tyndall, 8, 21, 23, 24, 29.

Valpol, 144.
Verworn, Max, 246.
Volhard, 84 y ss.
Volta, 58.
Vulquín, 127.

Warburg, 234.
Wassermann, 105, 182.
Waage, 176.
Weimarn, 13, 18.
Weinland, 207, 208.
Weisenheimer, 243.
Wheweli, 31.
Wieland, 239, 245.
Wilhelm, 64.
Wilson, 115.
Williamson, 34, 35.
Willstäter, 158, 163, 203, y ss. 211, 219, 220, 224, 261.
Wohler, 80, 262.
Wood, 163.

Zsigmondy, 8, 12, 24, 73, 98.
Zuckerkandi, 69.

Índice alfabético

Acetona, 256.
Acidez actual, 133 y ss.
— latente o de reserva, 134.
— total, 134 y ss.
Ácido aceto-acético, 256.
— α acetonicoglutárico, 233.
— α aminoiso caprónico o leucina, 270.
— bromhídrico, 270.
— butírico, 256.
— caprónico, 256.
— esteárico, 122.
— glutamínico, 233.
— homogenístico, 252.
— margárico, 122.
— oleico, 122.
— oxibutírico, 256.
— palmítico, 122.
— succínico, 233.
— úrico, 244.
Ácidoalbúminas, 120.
Ácidos biliares, 203.
Activadora, 239.
Activadores de fermentos, 198.
Activos sobre la tensión superficial, 91.
Acción de protección, 77.
— de los venenos sobre los fermentos, 104.
Acciones por contacto, 172.
Adenasa, 244.
Adenina, 244.
Adrenalina, 207, 216.
Adsorción, 87, 93, 104.
— eléctrica, 101.
— mecánica, 101.
— negativa, 92.
— positiva, 92.
— química, 102.
Aerobia, 248.
Afinidades mecánicas, 126.
— libres, 100.
Agente, 238.
Aglutininas, 104.
Aglutinoscopio, 29.
Agua destilada ópticamente vacía, 22.
— ópticamente vacía, 21.
— ordinaria sin hervir, 138.
Alanil-alanina, 194.
d-alanil-glicil-glicina, 194.
Alanil-glicina, 194.
Alanina, 268.
Albúminas, 111, 267.
Albumosas, 111.
Alcalialbúminas, 111, 120.
Alcalinidad actual, 134.
— latente, 133 y ss.
— total, 134.
Alcohol exatómico, 263.
Alcoholes poliatómicos, 263.
Alcoholoxidasas, 243.
Aldehido fórmico, 265.
Aldosas, 263.
Alkaptona, 252.
Alkaptonuria, 251 y ss.
Almidón, 206, 264, 265.
Amarillo de alizarina, 142.
Amigdalasa, 221, 223.
Amigdalina, 181.
Amilasa, 200, 207, 260.
Aminoácidos, 111, 207, 267.
Amino-acidurias, 251.
Amoníaco, 271.
Anfóteros, 112.
Anhidrosas o polisacáricos, 264.
Anillos de Liesegang, 68 y ss.
Anión, 32.
Ánodo, 32.
Anticuerpos, 104 y ss.
Antiescorbútico, 108.
Antifermentos, 203, 207.
Antígenos, 104 y ss.
Antitoxinas, 105.
Antitripsina, 207.
Arginasa, 231.
Arginina, 207.
Aspectos mielínicos, 124.
Astrosferas, 81.
Aurum potabile, 15.
Autocatálisis negativa, 182.
— positiva, 183.
Autolisis, 227.
Azúcar dializable, 50.
— libre, 50.
Azul de Prusia, 7.

Bacteriolisinas, 105.
Bases púricas, 207.
Basicidad actual, 135.
Beggiaota mirabilis, 129.

Biosas, 264.
Bromisocapronilglicina, 270 y ss.
Bromuro amónico, 271.
— de bromoisocapronilo, 270.
Brucina, 273.

Cadaverina, 252.
Cadena de concentración, 148.
Caldo de cultivo, 138.
Calor inicial, 248.
— retrasado, 248.
Canfocarbónico, 196.
Capilares activos, 91.
Caracteres ópticos, 20.
Carbohidrasas, 218.
Carga eléctrica de los coloides, 53.
Caseína, 111.
Cataforesis, 117.
— eléctrica, 51.
Catalasa, 189, 197, 236, 237, 262.
Catálisis, 171, 172.
— por adsorción, 102, 185, 189.
— inorgánica, 173.
— en sistemas heterogéneos, 185.
— en sistemas homogéneos, 184.
— por transmisión, 183.
Catalizadores, 174.
Catión, 32.
Cationes, 31.
Cátodo, 31.
Celentéreos, 49.
Celobiasa, 220.
Celulasas, 222.
Celulosa, 265.
Cetosas, 263.
Chimosina, 229.
Cianhidrina, 196.
Cisteína, 207.
Cistina, 207.
Cistinuria, 251.
Citolisis, 127 y ss.
Cloruro de cloroacetilo, 271.
Coagulación, 61, 75.
— por la acción de las sales, 119.
— por el calor, 119.
— eléctrica, 76.
— electrolítica de los emulsoides, 76.
— por electrolitos, 75.
Coagulaciones reversibles, 79.
Cociente respiratorio, 267.
Coenzimas, 205.
Cofermentos, 161, 203, 205.
Colágena, 111.
Colesterina, 123.
Colina, 123.
Coloidal de yoduro de plata, 53.
Coloides, 3, 8, 10, 12.
— emulsoides, 123.
Colorantes lipótropos, 126.
— neutótropos, 126.
Comparador de Walpol, 144 y ss.
Complementos, 104.
Condensación, 15.
Condensador, 25.
— cardioide, 25.
— parabólico, 25.
— paraboloide, 25.
Constante de Avogadro, 27.
— de disociación, 118, 136.
— de los gases, 40.
Constitución de protoplasma, 79.
Corales, 49.
Cristales de albúmina, 71
Cristaloide, 105.

Desamidación, 244.
Desaminasas, 231.
Desecación, 73.
Deshidrasas, 239.
Deshidrogenasas, 239.
Desnaturalización de los albuminoides, 120.
Dextrógiro, 196.
Diálisis, 6, 161.
— compensada, 50.
Diaminuria, 251 y ss.
Diastasas, 221, 260 y ss.
Difusión, 4.
α-dinitrofenol, 142.
β-dinitrofenol, 142.
γ-dinitrofenol, 142.
Disacarasas, 192.
Disociación electrolítica, 31.
Dispersidad, 10.
Dispersión, 15.
— grosera, 12, 14.
— molecular, 10, 12.
Dispersoides, 10.
Divisiones mecánicas, 8, 10.
Donator, 239.

Ectodermo, 82.
Edemas, 83.
Elastina, 111.
Electrodo de calomelanos, 149.
— normal, 147.
— de pera, 149 y ss.
— de tubo, 149 y s.
Electrodos o pares, 149.
Electroforesis, 51.
Electrólisis, 32.
Electrólitos, 32, 42.
Electrones, 55.
Electrósmosis, 52.
Electrosomas, 55.
— coloidales, 56.
Emigración de los electrosomas, 57.
— de los iones, 56.
Emulsina, 181, 196, 197, 207, 222, 262.
Emulsión, 13, 14, 65.
Emulsoides, 13, 14, 20, 61.
— solvatizados, 61, 63.
Endodermo, 82.
Energía superficial, 88, 93.
Enterokinasa, 203.
Enturbiamiento, 20, 22.
— microscópico, 23.
Enzyma, 159.
Eptosas, 264.
Equilibrio osmótico de Donnan, 31, 44, 70.
— químico, 175.
— de la reacción, 176.

Erepsina, 230, 260.
— en el jugo entérico, 159.
Especificidad, 191.
Espectros de difusión, 22.
Espongina, 111.
Esponjas, 49.
Espuma, 13.
Esquema de Nernst, 36.
Estarasas, 165.
Estearina, 122, 266.
Esterasa, 262.
Esteres, 165.
Estructura espumoide del protoplasma, 80.
Estufa de temperatura constante, 169.
Eucoloides, 14, 110.
Exanas, 264, 265.
Exosas, 264, 265.
Experiencia de Galvani, 58.
Experiencias de Perrin, 28.
Extraídos del tiroides, 207.

Falsos equilibrios, 182.
Fase anaerobia, 248.
Fécula, 265.
Fecundación del huevo, 81.
Fenilalanina, 252.
Fenolasas, 242.
Fenolftaleína, 142.
Fenómeno de Tyndall, 8, 21 y ss.
Fenómenos secretorios, 83.
Fermentos, 101, 157, 159, 205.
— defensivos, 168, 257.
— no figurados, 159.
— inorgánicos, 189.
— proteoclásticos, 162.
— proteolíticos, 159, 257.
— puros, 211.
Fibrino-fermento, 231.
Fibrinógeno, 111.
Fibroína, 111.
Figuras cario-quinéticas, 79.
Fitasa, 225.
Fitina, 225.
Fluidez, 63.
Fluorescencia, 21.
Forma activa, 134.
— ionizada, 134.
Fórmula de Guldber y Waage, 176.
Fosfatasa, 225.
Fosfátidas, 123.
Fosfatos inorgánicos, 206.
Fosfoproteínas, 111.
Fructosa o levulosa, 265.
d-fructosa, 192.
l-fructosa, 192.
Fucsina, 7.
Función acetónica, 263.
— aldehídica, 263.

d-galactosa, 192, 265.
l-galactosa, 192.
Ganoideos, 49.
Gaskettenmethode, 146.
Gástrula normal de Echinus microtuberculatus, 82.
— de Sphaerechinus granularis, 82.
Gastrulación, 79, 82.
Gel de yoduro de plata, 78.
Gelatinas emulsoides, 73.
Gelatinización, 61, 65.
Geles, 61.
Gérmenes llamados ultrafiltrantes, 26.
Genciobiasa, 221.
Glaucoma, 84.
Glicerina, 266.
Glicil-alanina, 194.
Glicil. d. l. leucil. glicina, 271.
Glicil-phenil-alanina, 194.
Glicil-l-tirosina, 181.
Glicil-tirosina, 194.
Glicocola, 181, 268, 270.
— o glicina, 270 y ss.
Glicoproteidos, 111.
d-glicosa, 192.
l-glicosa, 192.
Glicosidasa, 262.
Globulinas, 111.
Glucasa, 193.
Glucobiosas o disacáridos, 264, 265.
Glucógeno, 264 y ss.
Glucomonosas o monosacáridos, 264.
Glucosa, 265 y ss.
Glucosidasas, 192.
Glucotriosas o trisacáridos, 264.
Goma guta, 51.
Grado de disociación, 35.
Granos de soya, 188.
Grasas, 165, 266.
— neutras, 122.
Grupos prostéticos, 111.
Guanasa, 244.
Guanina, 244.

Hemicelulasas, 222.
Hemocianina, 111.
Hemoglobina, 111.
Hemolisinas, 105.
Hemolisis, 127.
Heteriones, 56.
Heteroiones, 55.
Hexosafosfatasa, 225.
Hialoplasma, 81.
Hidratos de carbono, 165, 263.
Hidrófilos, 14, 20, 61.
Hidrófobos, 14, 20, 61.
Hidrolasas, 217.
Hidroplasma, 81.
Hidrosoles sólidos, 78.
Hidrotropa, 121.
Hidróxido de hierro coloidal, 52, 76.
Hidroxiliones, 132.
Hinchamiento por imbibición, 70, 73.
Hipoxantina, 244.
Hipoxantinoxidasa, 244.
Histidina, 207.
Histolisis, 227.
Histonas, 111.
Hormonas, 216.
Humo, 13.
Hystéresis, 73.

Imágenes de Laue, 23.
Imbibición de las partículas, 61.

Imitación de la cariokinesis, 80.
— de hongos, 80.
Indicadores, 137.
Indicán, 254.
Indicanuria, 254.
Índice de oro, 78.
Inductor, 238.
Inmunidad, 104.
Inmuni-reacciones, 106.
Insulina, 255.
Intarvina, 255 y ss.
Interferómetro, 168.
Inulasa, 222.
Inulina, 265.
Invertasa, 188, 197, 215.
Iones, 10, 14, 53, 54.
— electrolíticos, 54.
— de hidrógeno, 132.
— libres o activos, 135.
— micelares, 55.
Ionimetría, 135.
Isoeléctrico, 117.
Isomaltosa, 264.
Isomería funcional, 264.
Isosmóticas, 37.
Isoterma de adsorción de Freundlich, 97.
— de la reacción, 176.
Isotónicas, 37.

Jugo estomacal, 138.
— intestinal, 203.
— pancreático. 206.

Keratina, 111.
Kinasa, 203.

Lab, 225, 229, 259.
Lacasa, 241.
Lactasa, 193, 197, 219, 261.
Lactoalbúmina, 111.
Lactosa, 264, 265.
Lanolina, 123.
Lecitina diesteárica, 123.
Lecitinas, 123.
Leucil-alanina, 194.
Leucil-glicil-glicina, 194.
Leucil-glicina, 194, 271.
Leucina, 268.
Levógiro, 196.
Levulasa, 159.
Ley de Avogadro, 40.
— de Boyle-Mariotte, 39.
— de Faraday, 54.
— de Gay-Lussac, 39, 41.
— de la independencia de emigración de los iones, 33.
— de Pfeffer, 33.
— de Schultz, 186.
— de Schultz-Boristow, 187.
— de Stokes, 28.
— de Weimarn, 16.
Limpieza de los fermentos, 161.
Liófilos, 14, 61.
Liófobos, 14, 61.
Lipasa, 90, 165, 197, 198, 203, 207, 213, 260, 261.
Lipasa, pancreática, 203.
Lipoidasa, 225.
Lipoides, 122.
Lisinas, 104.
Luciferasa, 242.
Luciferina, 242.
Lyotropa, 121.

Maltasa, 219, 261.
Maltosa, 206, 264.
Mamíferos, 49.
d-mannosa, 192.
l-mannosa, 192.
Margaro-estearo-oleína, 267.
Melezitosa, 264.
Melibiasa, 221.
Membrana lipoides de Overton, 125.
— semipermeable, 38.
Merotomía celular, 81.
Método de las gotas, 88.
— de Sorensen, 141.
— de Walpol, 144.
Métodos mecánicos de coagulación,78.
Mezcla de fosfatos, 169.
— reguladora, 139.
Mezclas críticas, 66.
Micelas, 161.
— coloidales, 56.
— monomoleculares, 113.
Moléculas, 14.
Monosacarasas, 192.
Monosacáridos, 265.
Monosas, 264.
Movimiento browniano, 27.
Movimientos amiboides, 79.
Mucina, 111.

Narcosis, 109.
Nefelómetros, 29.
Nefritis, 83.
Niebla, 13.
Niederschlagsmembranen, 59.
m-nitrofenol, 142.
p-nitrofenol, 142.
Nonosas, 264.
Nucleasa, 262.
Nucleinacidasa, 223, 244.
Nucleínicos, 223.
Nucleoalbúminas, 111.
Nucleoproteicos, 111.
Nucleosidasa, 224, 244.
Nucleósido, 223.
Nucleotidasa, 224, 244.
Nucleótido, 223.
Nutraminas, 107.

Ocronosis, 253.
Octosas, 264.
Oleína, 122, 266.
Opalescencia, 22.
Orientación de las moléculas, 100.
Orina normal, 138.
Oro coloidal, 15, 53.
— — azul, 16.
— rojo, 7.
— — coloidal, 15.
Osmosis, 31.

Ovoalbúmina, 111.
Ovovitelina, 111.
Oxidasas, 217, 237.
Oxidonas, 245.
Oxigenasa, 242.
Oxiluciferina, 242.
Oxynitrilasa, 223.

Palmitina, 122, 266.
Palmito-estearo-oleína, 266.
Pancreatina, 260.
Papaína, 197, 207.
Papayotina, 227.
Parásitos ultramicroscópicos, 29.
Partenogénesis, 128.
Partículas coloidales, 8.
Película molecular lipoídica, 109.
Pentosanas, 264.
Pentosas, 264.
Pentosuria, 254.
Pepsina, 159, 203, 207, 225, 228.
— del jugo estomacal, 159.
— libre de lab, 259.
Pepsinógeno, 203, 204.
Peptasas, 225, 230.
Péptidos, 111.
Peptización, 61, 78.
Peptonas, 111.
Perhidrasas, 241.
Permeabilidad de la membrana celulas, 125.
Peroxidasa, 197, 236, 237, 242.
Peróxido, 236.
Piedras de construcción, 267.
Pipeta cuentagotas, 89.
Plasmahaut, 126.
Plasmolisis, 37.
Plata coloidal, 18.
Polipeptidasa, 260.
Polipéptidos, 267.
Polisacarasas, 192.
Potencial debido a la adsorción, 55.
— de disociación, 55.
— eléctrico, 48.
— electrokinético, 56.
— electrostático, 55.
Potenciales térmicos, 102.
Precipitados, 7.
— finos, 8.
Precipitación periódica, 68 y ss.
Precipitinas, 104.
Preedema, 85.
Prensa de Bruchner, 161.
Prensas trituradoras, 160.
Presión osmótica, 36 y ss.
Procedimiento biológico, 162.
Productos homogéneos, 10.
Protaminas, 111.
Proteasas, 225.
Proteidos, 111.
Proteínas, 111.
Prunasa, 223.
Ptialina, 159.
— de la saliva, 159.
Puffer, 112.
Pulverización eléctrica de metales, 18.
Punto isoeléctrico, 53, 57.
Punto neutral del agua, 136.
Purinas, 244.
Putrescina, 252.

Quellung, 70.
Quinidina, 196.
Quinina, 196.

Racémicos, 268.
Radiaciones ultravioleta, 11.
Radioactividad, 4.
Raquitismo, 108.
Rayos X, 23, 29.
Reacción de Meinicke, 105.
— de Sachs Georgi, 105.
— de Wassermann, 105.
Receptor, 238 y ss.
Reductasas, 217.
Regla de Coehn, 57.
Reglas de Freundlich, 99.
Reguladores, 112, 138.
Reptiles, 49.
Reticulina, 111.
Rojo de congo, 7.

Sacarasa, 159, 203, 211.
— o invertasa, 220, 261.
Sacarosa, 264, 265.
Sangre en circulación, 138.
Saponina, 128, 199.
Schulzwirkung, 77.
Secretina, 208.
Sericina, 111.
Serie de iones de Hoffmeister, 171.
— liófila de Hoffmeister, 71.
Seroalbúmina, 111.
Seroglobulinas, 111.
Sinéresis, 68.
Síntesis biofísica, 79.
Sistema complejo, 198.
Sistemas dispersos, 10.
— homogéneos, 10, 14.
— polidispersos, 55.
Soles, 61.
Solución, 6.
— normal, 136.
Soluciones *ópticamente vacías*, 21.
— verdaderas, 8.
Sorbita, 243.
Sorbosa, 243.
Sorción, 94.
Stalagmómetro de Traube, 88.
Substancias lipoídicas, 105.
Sulfato amónico, 162.
Suspensiones, 7, 13 y ss.
Suspensoides, 13, 14, 20, 61.
— gelatinas, 73.
Synéresis, 68, 71, 83.

Tabique semipermeable, 37.
Teleosteos, 49.
Temperatura crítica, 65.
Tensión interfacial, 87.
— superficial, 87, 90.
— total de la superficie, 88.
Teorema de Gibbs y Thomson, 92.
Teoría absortiva, 129.

Teoría alveolar, 79.
— filar, 79.
— granular, 79.
— de la membrana, 59.
— — ultrafiltrante, 129.
— molecular, 59.
— reticular, 79.
Termoestables, 205.
Termolábiles, 205.
Termostatos, 169 y ss.
Territorio coloidal, 24.
Tetanolisina, 105.
Tetrasacarasas, 192.
Tetrosas, 264.
Thyroxina, 216.
Timo, 207.
Tirosina, 207, 252.
l-tirosina, 181.
Tirosinasa, 205, 241.
Toxinas, 104 y ss.
Toxoides, 209.
Trabajo osmótico, 36, 42.
Trehalasa, 221.
Trehalosa, 264.
Tributirina, 89.
Triglicil-glicina, 194.
Triosas, 264.
Tripsina, 159, 201, 204, 225, 229, 260.
Triptófano, 207.
Trisacarasas, 192.
Tubos de Mett, 167.
Turgescencia, 37.

Ultrafiltración, 62.
Ultrafiltros, 63.
Ultramicroscopio, 8, 24, 29.
Urea, 199, 267.
Ureasa, 188, 197, y ss. 205, 207, 231.

Valor hemo y bacteriolítico, 105.
Variabilidad de su carga eléctrica en cantidad, 57.
Veratrina, 130.
Viscosidad, 63.
Viscosímetros, 63.
Vitamina A, 107.
— — antiberibérica, 108.
— B, 108.
— C, 108.
— D, 107.
— E, 107.
Vitaminas, 107.
— solubles en el agua, 107.
— — en las grasas, 107.

Xantinoxidasa, 244.

Zimasa, 205, 217, 234, 261.
Zimógenos, 203.
Zimoides, 203, 209.

PRÓXIMA PUBLICACIÓN:

Elementos de Bioquímica

Con aplicación a la Patología y al Diagnóstico

POR EL

Prof. E. RONDONI

TRADUCIDO DIRECTAMENTE DEL ITALIANO

POR EL

Dr. ANTONIO ARMENGOL Y PERECAULA

Introducción a la Química experimental.

Por el Prof. R. BLOCHMANN, trad. del Prof. A. GARCÍA BANÚS, de la Universidad de Barcelona. Con 163 páginas y 92 grabados.

(Colección Labor, N.° 1)

Introducción a la Química inorgánica.

Por el Prof. B. BAVINK, traducción del Prof. A. GARCÍA BANÚS, de la Universidad de Barcelona. Con 168 páginas y 31 grabados.

(Manuales Técnicos, Vol. 8)

Introducción a la Química general.

Por el Prof. B. BAVINK, traducción del Prof. A. GARCÍA BANÚS, de la Universidad de Barcelona. Con 165 páginas y 24 grabados.

(Manuales Técnicos, Vol. 9)

Introducción a la Química analítica.

Por el Prof. B. BAVINK, traducción del Prof. A. GARCÍA BANÚS, de la Universidad de Barcelona. Con 300 páginas y 19 grabados.

(Manuales Técnicos, Vol. 15)

Introducción a la Química orgánica.

Por el Prof. B. BAVINK, traducción del Prof. A. GARCÍA BANÚS, de la Universidad de Barcelona. Con 188 páginas y 9 grabados.

(Manuales Técnicos, Vol. 17)

PARA MÁS DETALLES PÍDASE FOLLETO EXPLICATIVO

BIBLIOTECA CONTEMPORÁNEA DE CIENCIAS MÉDICAS

Publicada con la colaboración de eminentes Profesores especialistas

Tamaño 16 × 24 cm. : : Encuadernación en tela

Microparasitología y Serología. Considerando especialmente los métodos de investigación que se exponen en los cursos de Bacteriología.

Por los Profs. Dr. E. GOTSCHLICH, Director del Instituto de Higiene de la Universidad de Giessen, y Dr. W. SCHÜRMANN, Prof. en el Instituto de Higiene de la Universidad de Halle. — 356 páginas con 213 ilustraciones, la mayoría de ellas en color.

Diagnóstico de las enfermedades de los niños. Con especial consideración de los niños de pecho.

Por el Prof. Dr. E. FEER, Director de la Clínica de Pediatría de la Universidad de Zurich. — 390 páginas con 240 ilustraciones.

Modernos métodos de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del riñón.

Por HUGH MACLEAN, M. D., DSc., Prof. de Medicina de la Universidad de Londres y Director de la Clínica médica del Hospital St. Thomas. 102 páginas con 4 ilustraciones y varios gráficos.

Diagnóstico quirúrgico de las enfermedades del riñón. Tratado práctico para el uso de Cirujanos y Urólogos, Médicos y Estudiantes.

Por el Prof. Dr. WILH. BAETZNER, de la Clínica quirúrgica de la Universidad de Berlín. — 391 páginas con 263 ilustraciones, la mayoría de ellas en color.

Terapéutica de las enfermedades de los niños. Con consideraciones generales acerca del diagnóstico y prescripciones farmacológicas especiales para la infancia.

Por el Prof. Dr. F. LUST, Jefe clínico de la Sección de Pediatría en la Universidad de Heidelberg. — 474 páginas.

Terapéutica de las enfermedades de la piel y venéreas.

Por el Prof. Dr. J. SCHÄFFER, de la Universidad de Breslau. — 477 páginas con 87 ilustraciones.

Cuidado y tratamiento de las heridas y de los focos de infección cerrados.

Por el Dr. W. VON GAZA, Prof. de la Clínica quirúrgica de la Universidad de Göttingen. — 320 páginas con 32 grabados, algunos en color.

Análisis clínicos. El Microscopio y la Química al servicio de la Clínica.

Por el Dr. H. LENHARTZ, de la Universidad de Leipzig, y el Profesor ERICH MEYER, de la Universidad de Estrasburgo. — 400 páginas con 196 grabados, muchos de ellos en color.

Terapéutica clínica de las enfermedades internas.

Por el Prof. Dr. G. KLEMPERER, de la Clínica médica de la Universidad de Berlín. — 250 páginas. *(En prensa).*

EN PREPARACIÓN NUEVOS VOLÚMENES

A solicitud remitimos gratis catálogo y folletos especiales de todas nuestras publicaciones

LAS ESPECIALIDADES EN LA MEDICINA PRÁCTICA

Publicado con la colaboración de eminentes Profesores especialistas

Tamaño 16 × 24 cm. :: Encuadernación en tela

I. **Tuberculosis.**

Por el Prof. Dr. G. Deycke, Médico Jefe de la Sección de Medicina interna y Director del Hospital General de Lübeck. — 335 páginas con 2 ilustraciones.

II. **Enfermedades infecciosas :** Su moderna interpretación.

Por el Prof. Dr. G. Jürgens, de la Universidad de Berlín. 374 páginas con 112 gráficos.

III. **Enfermedades del oído.**

Por los Profs. Dres. A. Jansen y F. Kobrak, de la Universidad de Berlín. — 400 páginas con 104 ilustraciones.

IV. **Enfermedades del riñón.**

Por el Prof. Dr. L. Lichtwitz, Director del Hospital de Altona. 282 páginas con 2 ilustraciones y 34 gráficos.

V. **Enfermedades del corazón y de los vasos.**

Por los Dres. Heinrich Hochhaus, Prof. de la Academia de Medicina práctica de Colonia, y G. Liebermeister, Director de la Sección de Medicina interna del Hospital de Düren. — 352 páginas con 72 ilustraciones.

VI. **Psiquiatría para el médico práctico.**

Por el Dr. H. W. Gruhle, Prof. de la Universidad de Heidelberg. 320 páginas con 23 ilustraciones.

VII. **La Sífilis :** Con especial consideración de los órganos internos. Su diagnóstico y tratamiento.

Por los Dres. E. Meirowsky, Prof. de la Universidad de Colonia, y Félix Pinkus, Prof. de la Universidad de Berlín. — 600 páginas con 79 ilustraciones, la mayor parte en color.

VIII. **Enfermedades del estómago y del intestino.**

Por el Dr. K. Faber, Prof. de la Universidad de Copenhague. — 305 páginas con 70 ilustraciones.

IX. **Enfermedades de la sangre.**

Por el Dr. E. Rosenow, Prof. de la Universidad de Jena. — 260 páginas con 43 ilustraciones. *(En prensa).*

X. **Ortopedia indispensable.**

Por el Prof. Dr. August Blenke, de la Universidad de Magdeburgo. 310 páginas con 101 ilustraciones. *(En prensa).*

EN PREPARACIÓN NUEVOS VOLÚMENES

A solicitud remitimos gratis catálogo y folletos especiales de todas nuestras publicaciones

Diagnóstico diferencial de las enfermedades internas

Por el Prof. Dr. M. MATTHES, de la Universidad de Königsberg. 800 páginas con 109 grabados. Tamaño 25×18 cm.

Tratado de Diagnóstico Quirúrgico

Por el Prof. F. DE QUERVAIN. Segunda edición española. 900 páginas, 731 grabados y 7 láminas en color. Tamaño 25×18 cm.

Farmacología

Por el Dr. E. POULSSON, Profesor de Farmacología en la Universidad de Cristianía. Traducido de la 7.ª edición alemana por don ADRIANO PANADERO, Doctor en Farmacia y Medicina. 600 páginas con 32 grabados. Tamaño 16×24 cm.

Medicamenta

Formulario-guía teórico-práctico para Farmacéuticos, Médicos y Veterinarios.

Traducido de la última edición italiana por el Dr. ENRIQUE SOLER Y BATLLE, Catedrático de Farmacia Práctica de la Universidad de Barcelona. 3.ª edición. Dos tomos, con un total de 2,000 páginas.

Bacteriología y Esterilización aplicadas a la práctica farmacéutica

Con un detenido estudio de la preparación de soluciones esterilizadas en ampollas cerradas a la lámpara. Por el Dr. CONRAD STICH, de la Universidad de Leipzig. Traducido de la 4.ª edición alemana. 300 páginas con 147 ilustraciones, muchas de ellas en color, y 3 láminas. Tamaño 16×24 cm.

Farmacognosia **(Materia farmacéutica vegetal y animal)**

Por el Dr. ERNST GILG, Prof. de Botánica y Farmacognosia en la Universidad de Berlín, y Dr. WILHELM BRANDT, Prof. de Farmacognosia en la Universidad de Francfort d. M. Traducido de la 3.ª edición alemana. 532 páginas con 407 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Botánica aplicada a la Farmacia

Por el Dr. ERNST GILG, Prof. de Botánica y Farmacognosia en la Universidad de Berlín. Traducido de la 6.ª edición alemana. 528 páginas con 569 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Compendio de Química **para Médicos, Farmacéuticos, Químicos y Naturalistas.**

Por el Prof. Dr. HERMANN THOMS, Consejero y Director del Instituto Farmacéutico de la Universidad de Berlín. Traducido de la 7.ª edición alemana. 600 páginas con 108 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Análisis clínicos

Por el Prof. H. LENHARTZ † de la Universidad de Leipzig y el Prof. Doctor E. MEYER, Ex-Director del Laboratorio de la Universidad de Estrasburgo. 600 páginas con 196 ilustraciones, la mayoría de ellas en color. Tamaño 16×24 cm.

Para más detalles de estas obras ofrecemos gratis folleto explicativo

Diagnóstico diferencial de las enfermedades internas

Por el Prof. Dr. M. MATTHES, de la Universidad de Königsberg. 800 páginas con 109 grabados. Tamaño 25×18 cm.

Tratado de Diagnóstico Quirúrgico

Por el Prof. F. DE QUERVAIN. Segunda edición española. 900 páginas, 731 grabados y 7 láminas en color. Tamaño 25×18 cm.

Farmacología

Por el Dr. E. POULSSON, Profesor de Farmacología en la Universidad de Cristianía. Traducido de la 7.ª edición alemana por don ADRIANO PANADERO, Doctor en Farmacia y Medicina. 600 páginas con 32 grabados. Tamaño 16×24 cm.

Medicamenta

Formulario-guía teórico-práctico para Farmacéuticos, Médicos y Veterinarios.

Traducido de la última edición italiana por el Dr. ENRIQUE SOLER Y BATLLE, Catedrático de Farmacia Práctica de la Universidad de Barcelona. 3.ª edición. Dos tomos, con un total de 2,000 páginas.

Bacteriología y Esterilización aplicadas a la práctica farmacéutica

Con un detenido estudio de la preparación de soluciones esterilizadas en ampollas cerradas a la lámpara. Por el Dr. CONRAD STICH, de la Universidad de Leipzig. Traducido de la 4.ª edición alemana. 300 páginas con 147 ilustraciones, muchas de ellas en color, y 3 láminas. Tamaño 16×24 cm.

Farmacognosia **(Materia farmacéutica vegetal y animal)**

Por el Dr. ERNST GILG, Prof. de Botánica y Farmacognosia en la Universidad de Berlín, y Dr. WILHELM BRANDT, Prof. de Farmacognosia en la Universidad de Francfort d. M. Traducido de la 3.ª edición alemana. 532 páginas con 407 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Botánica aplicada a la Farmacia

Por el Dr. ERNST GILG, Prof. de Botánica y Farmacognosia en la Universidad de Berlín. Traducido de la 6.ª edición alemana. 528 páginas con 569 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Compendio de Química **para Médicos, Farmacéuticos, Químicos y Naturalistas.**

Por el Prof. Dr. HERMANN THOMS, Consejero y Director del Instituto Farmacéutico de la Universidad de Berlín. Traducido de la 7.ª edición alemana. 600 páginas con 108 ilustraciones. Tamaño 16×24 cm.

Análisis clínicos

Por el Prof. H. LENHARTZ † de la Universidad de Leipzig y el Prof. Doctor E. MEYER, Ex-Director del Laboratorio de la Universidad de Estrasburgo. 600 páginas con 196 ilustraciones, la mayoría de ellas en color. Tamaño 16×24 cm.

Para más detalles de estas obras ofrecemos gratis folleto explicativo