DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA
de la
Universidad de Concepción (Chile)
Director: Prof. Dr. B. Günther

OXIDACIONES BIOLOGICAS

Introducción teórica y experimental

(con 12 figuras y 3 tablas)

por

B. Günther y E. Poch

(Recibido por la Redacción el 30-VII-47)

"...la vida no sabe sino de un combustible: el hidrógeno..."
A. v. Szent-Györgyi (1943).

Poco tiempo después del descubrimiento del oxígeno por **Priestley** (1774) pudo demostrar **Lavoisier** (1777) que los fenómenos vitales están en íntima relación con los procesos oxidativos. Desde entonces las investigaciones realizadas sobre este tema han sido numerosas y complejas. Las recientes adquisiciones se encuentran en forma dispersa en la literatura científica mundial, razón por la cual existe la necesidad de reunir —en un trabajo de conjunto— los hechos más importantes alcanzados hasta el momento.

Como consecuencia de este gran progreso los conceptos clásicos de oxidación —combustión del carbono de los alimentos por el oxígeno proveniente del aire— se han modificado radicalmente. No es el carbono sino que es el hidrógeno del substrato el que entrega por etapas sucesivas su energía hasta que se combina con el oxígeno para formar agua. El agua debe considerarse entonces como el producto final de las oxidaciones biológicas. En la transferencia escalonada del hidrógeno intervienen catalizadores tisulares y substancias que desempeñan la función de transportarlo. Por otra parte, es necesaria la activación del oxígeno —también con la intervención de fermentos especiales— para que éste pueda reaccionar con el hidrógeno a la temperatu-

ra corporal. Conjuntamente con el transporte de hidrógeno se realiza —también en etapas— el de los electrones. La energía que se requiere para el metabolismo celular proviene de estas transferencias de hidrógeno y de electrones.

En cuanto al CO_2, que antiguamente se consideraba como el producto lógico de la combustión intracelular, ha resultado ser simplemente la consecuencia de descarboxilaciones en el substrato.

Hemos creído útil agregar a la discusión teórica algunos sencillos experimentos de óxido-reducción, destinados a demostrar objetivamente mecanismos de transporte de hidrógeno o de electrones, y a ilustrar las nociones teóricas expuestas.

En los seres unicelulares el oxígeno necesario difunde fácilmente hacia el interior de las células desde el exterior; en cambio, en los pluricelulares es la sangre —por intermedio de la hemoglobina de los hematíes— la que se encarga de transportar el oxígeno desde el aire atmosférico hasta la célula que lo utiliza. El oxígeno es incapaz de oxidar directamente a los hidratos de carbono y a las grasas a la temperatura corporal, razón por la cual se hace necesaria su activación (oxidasas). Lo mismo sucede con el hidrógeno unido al carbono en las diferentes substancias alimenticias. Esta unión es muy poderosa y la ruptura de este enlace, haciendo posible la unión del hidrógeno con el oxígeno para formar agua, sólo es factible gracias a la intervención de fermentos específicos (deshidrogenasas). Entre ambos extremos existen una serie de substancias fisiológicas que poseen la interesante propiedad de poder oxidarse y reducirse sucesivamente (substancias óxido-reductoras). El orden en que se han hecho los descubrimientos de los distintos factores que intervienen en la oxidación biológica muestran la evolución de los conceptos que se han tenido al respecto.

A) **Desarrollo histórico:**

1.—"Activación del oxígeno", por catalizadores del tipo del "fermento respiratorio" de **Warburg** (1927).

2.—"Activación del hidrógeno" con intervención de las deshidrogenasas **(Thunberg** y **Wieland).**

3.—"Activación de ambos procesos". **(Keilin).**

4.—"Transportadores de hidrógeno"; substancias fisiológicas descubiertas por **Szent-Györgyi.**

De acuerdo con estos conocimientos el problema de la oxidación biológica se plantea de una manera más compleja, pudiéndose resumir en la siguiente forma:

1) Substrato + transportador oxidado = transportador reducido + substrato oxidado

2) Transportador reducido + O_2 = transportador oxidado + H_2O

Sólo al excluir las fases intermedias (transporte de hidrógeno) se tiene la expresión clásica de los procesos oxidativos:

3) Substrato + O_2 = substrato oxidado + H_2O

B) **Formas de oxidación:**

En condiciones fisiológicas toda oxidación está ligada a una deshidrogenación, que no se realiza en forma instantánea, sino que por etapas sucesivas.

De acuerdo con la definición, la oxidación se refiere a la unión del oxígeno con una substancia cualquiera ($Fe + O = FeO$).

El término "oxidación" se aplica también al proceso en el cual se pierde hidrógeno, como sucede por ejemplo con el leucoderivado del azul de metileno que pasa a la forma coloreada (azul) cuando este cuerpo se deshidrogena por cualquier causa (véase demostración N.º 1 en la parte experimental de este trabajo).

Si se analizan estos procesos bajo el punto de vista atómico, lo esencial de la oxidación resulta ser según **Michaelis** (1938) la pérdida de electrones (Exp. 2, 3, 4), lo cual trae consigo un cambio de la valencia; aumenta la carga positiva del átomo oxidado ($Fe^{++} - e = Fe^{+++}$)

Generalmente se realiza la transferencia de hidrógeno y de electrones al mismo tiempo; en otros casos los dos procesos siguen caminos diferentes, para volver a reunirse en la etapa final.

Al mismo tiempo que se produce la oxidación de una substancia acontece la reducción de la otra.

En consecuencia habrá reducción cuando existe:

a) desprendimiento de oxígeno;
b) captación de hidrógeno;
c) adquisición de electrones.

Puede decirse, que la reducción equivale a una captación de energía; la oxidación en cambio conduce a la liberación de ella. Cuando un sistema aumenta su contenido energético (reducción) ello se debe a un aporte exógeno de energía, lo cual nunca sucede espontáneamente. La célula viva sólo puede utilizar la energía acumulada en los alimentos; no puede generar por sí misma la energía necesaria para su metabolismo. Los cuerpos reducidos (ricos en hidrógeno) tienen un mayor contenido energético que los cuerpos oxidados.

En realidad el término de oxidante y de reductor es relativo; todo depende de la naturaleza de los cuerpos que se van a comparar. Una substancia puede ser oxidante con relación a un cuerpo y reductora con respecto a otro. Los valores extremos están representados por el hidrógeno (potencial más negativo) y el oxígeno (potencial más positivo). El cuerpo que tenga un potencial negativo será oxidado por todos aquellos más positivos que él, ya que la substancia de potencial negativo entrega electrones (se oxida) y la positiva los capta (se reduce). En última instancia el agente "reductor" es un dador de electrones y el "oxidante" un aceptador de ellos.

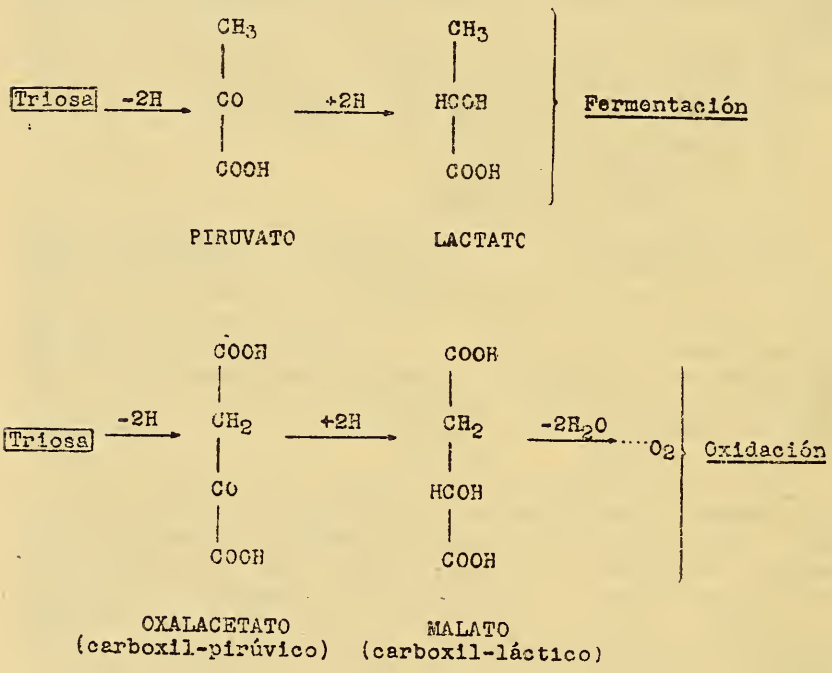
Existe también otra fuente de energía para el metabolismo celular: la fragmentación de las moléculas grandes o sea la "fermentación". Si bien es cierto, que este proceso es mucho más sencillo y primitivo, y se realiza en ausencia de oxígeno, es al mismo tiempo menos económico, pues se libera sólo una parte

de la energía acumulada en las moléculas. De acuerdo con **Lippman** una molécula-gramo de glucosa desprende en condiciones metabólicas "anaerobias" teóricamente 79 Calorías, y prácticamente sólo 54 Calorías; en cambio al ser oxidada esta misma substancia se liberan en total 686 Calorías. La fermentación entrega sólo el 8% del total de la energía que puede ser puesta en libertad por la oxidación. Según **Szent-Györgyi** en la evolución de los seres vivos el proceso de la fermentación debe haber precedido al de la oxidación.

Tanto la oxidación como la fermentación pueden partir del mismo substrato. La diferencia de los procesos reside en las substancias que aparecen en la degradación sucesiva de las moléculas. Así por ejemplo en la fermentación de la triosa (½ molécula de glucosa) ésta se transforma en piruvato por deshidrogenación y a su vez esta substancia —por captación de hidró-

Fig. 1

FERMENTACION Y OXIDACION DE LA TRIOSA
(según v.Szent-Györgyi)



geno— se transforma en lactato (Fig. 1). En la oxidación en cambio, la triosa se transforma en oxalacetato, malato, fumarato y succinato, y el hidrógeno transportado de substancia en substancia termina finalmente —a través de los citocromos y del fermento respiratorio— combinándose con el oxígeno (Fig. 1 y 2). Las substancias que intervienen en esta oxidación

son cuerpos de cuatro átomos de carbono y con dos grupos carboxílicos (ácidos C_4-dicarboxílicos de **Szent-Györgyi**), moléculas muy apropiadas para el transporte de hidrógeno. El piruvato y el lactato, que aparecen en la fermentación de la triosa, son sencillamente oxalacetato y malato que han sufrido una descarboxilación (Fig. 1). Las substancias intermedias de ambos procesos difieren sólo en un grupo CO_2.

Habíamos dicho anteriormente, que la oxidación de los metabolitos se producía gradualmente o sea en "etapas sucesivas". Estas reacciones en cadena tienen la ventaja de no liberar instantáneamente toda la energía encerrada en las substancias que se van a metabolizar. La oxidación de una molécula-gramo de hidrógeno con media molécula-gramo de oxígeno para formar agua, libera 68,000 pequeñas calorías o 68 kilocalorías (Cal.), que instantáneamente se transformarían en calor, no sólo sin provecho desde el punto de vista energético, sino que aún con el peligro de la destrucción tisular por el calor desarrollado.

Analizaremos ahora en forma sistemática los diferentes fermentos que intervienen en el transporte de hidrógeno, comenzando con las activadores de éste para terminar con los fermentos activadores de oxígeno.

C) Substancias que intervienen en los oxidaciones biológicas:

1) COFERMENTOS.—Fueron descubiertos por **Warburg** y **v. Euler.** Se encuentran en la levadura, en las células animales, en las células animales, en las plantas y en los bacterios. Son substancias transportadoras de hidrógeno o de electrones, que intervienen en la deshidrogenación del substrato. Se trata de nucleótidos (constituído por una base nitrogenada, un azúcar y por ácido fosfórico) que por hidrolisis dan: adenina, nicotinamida (Vitamina P. P.), pentosa (ribosa) y dos o tres moléculas de ácido fosfórico. La agrupación de los diferentes componentes es: (adenina-ribosa-2 ácido fosfórico-ribosa-nicotinamida).

Las deshidrogenasas (holoenzimo o enzimo total) se disocian en dos partes: 1) una "apodehidrasa" o "apoenzimo" de carácter proteico (peso molecular alto, termolábil) y que es específica para el substrato que será atacado por dicho fermento, y 2) una "codehidrasa" o "coenzimo" que es responsable de la acción óxido-reductora. El coenzimo es de bajo peso molecular y además es termoestable.

La diferencia entre el llamado **coenzimo I** y el **coenzimo II** es la siguiente: El **Co-I** es un difosfo-piridín-nucleótido que interviene, en la fermentación alcohólica del azúcar, en la oxidación de los ácidos láctico y málico. El **Co-II** es un trifosfo-piridín-nucleótido, que activa la oxidación de la hexosamonofosfato y del ácido cítrico. En ambos el grupo piridina actúa como transportador de hidrógeno según la reacción siguiente:

$$\text{Piridina} + 2H \rightleftharpoons \text{Dihidropiridina}$$

Esta reacción es reversible, y por lo tanto puede funcionar como sistema óxido-reductor.

2) GLUTATION.—Está formado por tres aminoácidos: glicina, ácido glutámico y cisteína. Este último contiene azufre y representa la fracción activa en los fenómenos de óxido-reducción. Cuando la cisteína (SH) entrega sus 2H pasa a cistina (S — S):

$$\begin{matrix} G-SH \\ G-SH \end{matrix} + \text{Aceptador} \longrightarrow \begin{matrix} G-S \\ | \\ G-S \end{matrix} + \text{Aceptador} : H_2$$

Glutation reducido — Glutation oxidado

El glutation existe en mayor o menor proporción en casi todos los tejidos animales.

3) FERMENTOS AMARILLOS.—Se encuentran en la levadura —donde fueron aislados por primera vez por **Warburg** y **Christian** (1932)— y también en los tejidos animales. Hasta ahora se han descrito 5 formas diferentes de ellos. Los fermentos amarillos constan de una proteína y de un grupo prostético (parte no proteica de una proteína conjugada). Están formados por un aloxacina-mononucleótido: (Adenina-ribosa-2 ác. fosfórico-ribosa-isoaloxacina) + proteína.

Una propiedad particular de estos fermentos amarillos explica por qué las intoxicaciones con óxido carbono (CO), ácido cianhídrico (HCN) y con ácido sulfhídrico (H_2S) no suspenden totalmente la respiración tisular. Estos fermentos están desprovistos de hierro, razón por la cual son insensibles a todas las substancias que presentan gran afinidad por este metal. Otra característica es su capacidad de oxidación en presencia del oxígeno libre, sin la intervención de una oxidasa.

4) LOS ACIDOS C_4-DICARBOXILICOS.—Fueron descubiertos como transportadores de hidrógeno por **A. von Szent-Györgyi.** Representan en algunos casos el eslabón entre los alimentos y el sistema de los citocromos que estudiaremos a continuación. Son substancias óxido-reductoras reversibles intracelulares. Ofrecen grandes ventajas por su estructura química, puesto que se sabe que los átomos de carbono en posición alfa y beta —con respecto al grupo carboxílico (COOH)— tienen una gran facilidad de reacción. En los ácidos C_4-dicarboxílicos hay doble motivo para explicar su gran labilidad, debido a que poseen dos de estos carbonos colocados entre grupos carboxílicos.

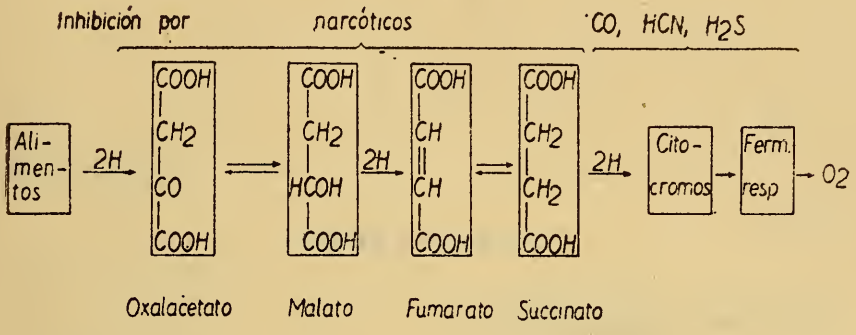
Las substancias que forman parte de este grupo son los siguientes ácidos: oxalacético, málico, fumárico y succínico (Fig. 2). El ácido fumárico, por captación de hidrógeno se convierte en succínico; éste a su vez es capaz de entregar el hidrógeno, convirtiéndose nuevamente en fumárico.

Los fermentos que activan las reacciones en los ácidos C_4-dicarboxílicos son los siguientes:

a) **Succino-deshidrogenasa** que activa la conversión del ácido succínico en fumárico, por deshidrogenación del succínico.

Fig. 2

Transporte de Hidrógeno por los ácidos C_4-Dicarboxílicos
(según v Szent-Györgyi, 1939)



b) **Málico-deshidrogenasa,** que interviene por deshidrogenación en la transformación del ácido málico en oxalacético.

Estos fermentos que activan los intercambios entre los ácidos C_4-dicarboxílicos pertenecen al grupo de las "deshidrogenasas anaeróbicas". Se trata de fermentos que intervienen en el transporte de hidrógeno de una substancia a otra, sin que jamás el hidrógeno movilizado pueda reaccionar directamente con el oxígeno molecular.

A diferencia del grupo anterior existen otros fermentos que facilitan la unión del hidrógeno del substrato con el oxígeno molecular. Pertenecen a él las "deshidrogenasas aeróbicas" como ser la xantino-deshidrogenasa, la uricasa, la d-aminoácidodeshidrogenasa (véase cuadro de resumen de fermentos).

El consumo de oxígeno del músculo pectoral del pichón decrece con el tiempo. Si se adiciona de cualquiera de los ácidos C_4-dicarboxílicos, ácido fumárico por ejemplo, se detiene el descenso de la intensidad respiratoria. El consumo de oxígeno es ahora mucho mayor que el necesario para la oxidación completa (hasta CO_2 y H_2O) de la pequeña cantidad de ácido fumárico adicionado.

La ubicación (Fig. 2) de los ácidos C_4-dicarboxílicos en las oxidaciones de los hidratos de carbono es la siguiente:

Triosa-oxalacetato-malato-fumarato-succinato-citocromos-oxígeno.

Según **Krebs** y **Johnson** (1937) intervienen también en el ciclo de los ácidos C_4-dicarboxílicos otros cuerpos intermediarios como el ácido cítrico y el α-cetoglútárico (Fig. 3).

Posteriormente **Evans** y **Slotin** (1941) han propuesto las modificaciones que aparecen en la Fig. 4.

5) ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C.—Se trata también en este caso de un óxido-reductor reversible que por pérdida de hidrógeno pasa de ácido ascórbico a dehidroascórbico (véase Fig. 5). La oxidación del ácido ascórbico es activada por un fermento específico, la "oxidasa ascórbica".

Fig. 3

CICLO DE KREBS

Hidratos de carbono

↓

piruvato

↓+

a) 2 oxalacetato + $2H_2O$ → citrato + malato + CO_2

b) citrato + $\frac{1}{2} O_2$ → ∝cetoglutarato + CO_2 + H_2O

c) ∝ cetoglutarato + $\frac{1}{2} O_2$ → succinato + CO_2

d) succinato + $\frac{1}{2} O_2$ → fumarato + H_2O

e) fumarato + H_2O → malato

f) 2 malato + O_2 → 2 oxalacetato + $2H_2O$

---

piruvato + $2\frac{1}{2} O_2$ → $3CO_2$ + $2H_2O$

Fig. 4

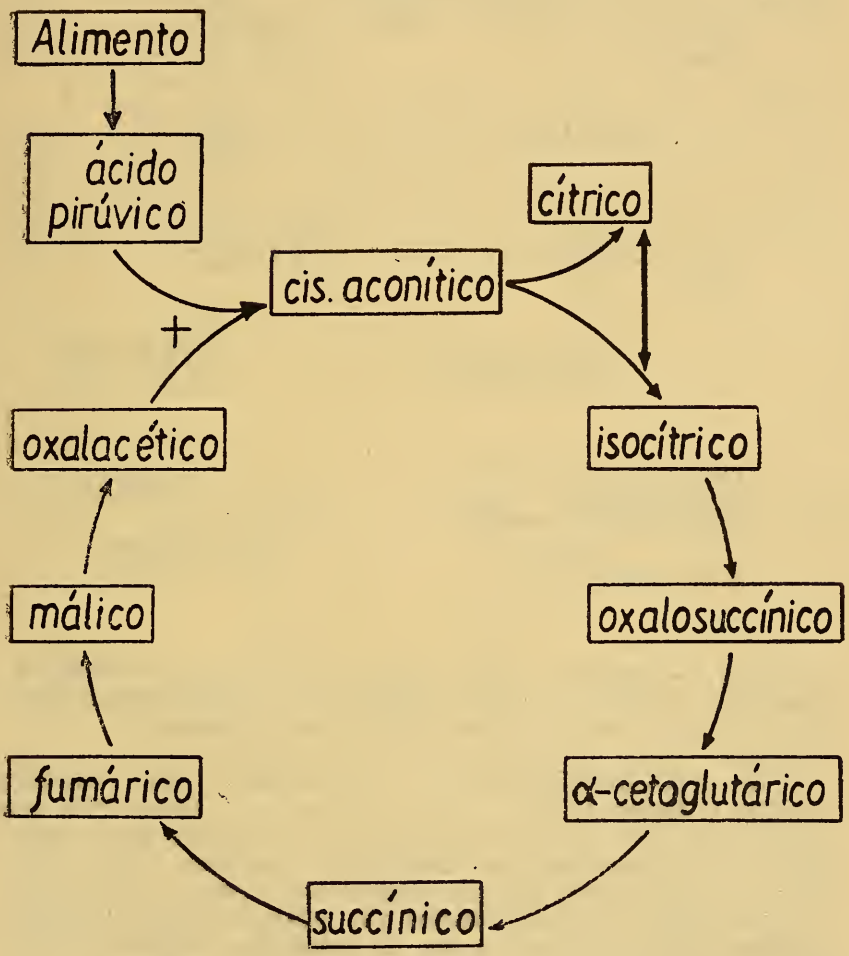
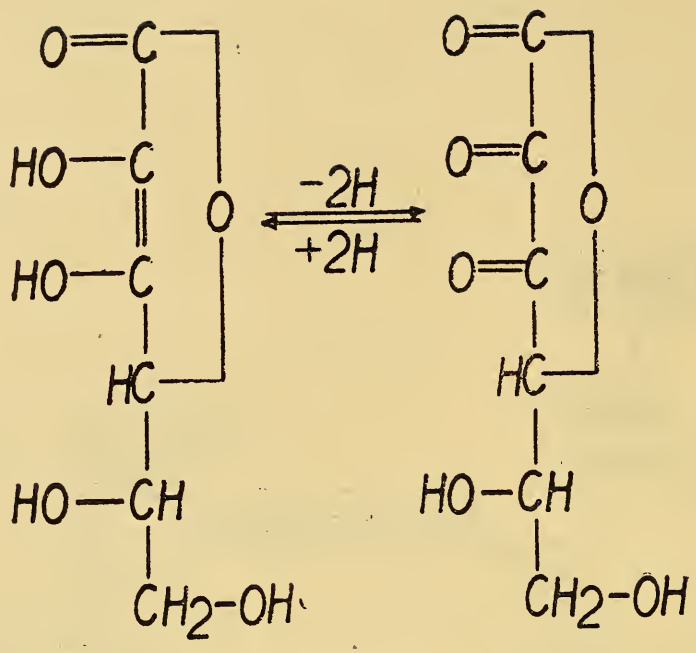

Alimento
ácido pirúvico
cítrico
cis. aconítico
+
oxalacético
isocítrico
málico
oxalosuccínico
fumárico
α-cetoglutárico
succínico

Fig. 5



El ácido ascórbico tiene fuertes propiedades reductoras; decolora por ejemplo el azul de metileno y el 2-6-diclorofenolindofenol (reacción utilizada para titular esta vitamina).

6) CITOCROMOS.—Fueron descubiertos por **Warburg** (1913) y **Keilin** (1925). No son fermentos respiratorios sino que substancias óxido-reductoras. Se han descrito 3 citocromos (a, b, c): de los cuales las formas **a** y **b** son sumamente lábiles, y su existencia sólo ha podido revelarse espectroscópicamente.

Los citocromos son cuerpos que pertenecen a los hemocromógenos. Están formados por un tetrapirrol del tipo "hemo" con un átomo de Fe y en combinación con una proteína, que no es la globina. No son autoxidables, por lo que se requiere de la intervención de un fermento específico, la "citocromoxidasa" (oxidable por el oxígeno molecular). Gracias a este fermento el ferrocitocromo se transforma nuevamente en ferricitocromo (forma oxidada).

Hay un estrecho paralelismo entre la actividad respiratoria de las células, la concentración de los citocromos y de la citocromoxidasa (fermento que estudiaremos a continuación). El

hidrógeno reacciona con la forma férrica del citocromo (ferricitocromo) de la siguiente manera:

$$\text{Cit. Fe}^{+++} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cit. Fe}^{++} + \text{H}^{+}$$

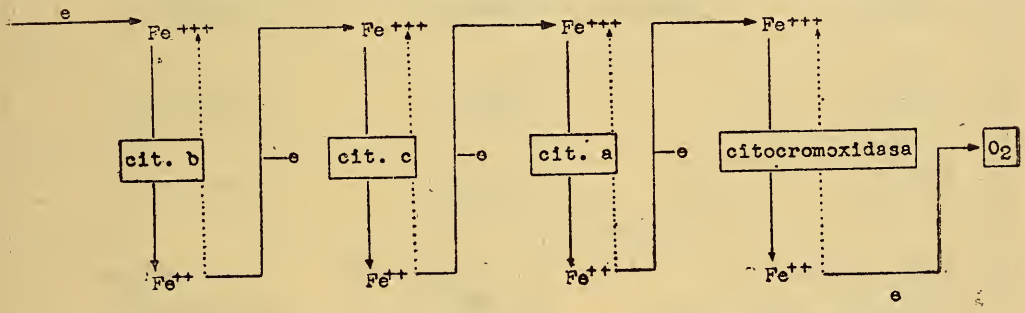
El hidrógeno entrega un electrón al ión férrico, pasando éste a ferroso; en el medio ambiente aparece entonces el hidrógeno en forma ionizada (H^+)

La función que desempeñan los citocromos en las oxidaciones es muy importante, ya que en condiciones máximas de trabajo cada molécula de citocromo c puede oxidarse y reducirse 1420 veces por minuto.

En cuanto al "fermento respiratorio" de Warburg, idéntico a la "citocromoxidasa" o la "indofenoloxidasa", debemos hacer notar que se trata de un fermento activador del oxígeno, esencial en los fenómenos aerobios. Este fermento es como hemos dicho, autoxidable; en presencia del oxígeno el hierro que contiene pasa del estado ferroso o férrico, y sólo ahora es capaz de captar los electrones del substrato oxidable (citocromos), con lo

Fig. 6

TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN LOS CITOCROMOS



que se reduce, (Fig. 6). En este momento interviene nuevamente el oxígeno, que transforma el ión ferroso en férrico. El fermento respiratorio hace las veces de aceptador de los electrones que le entregan los citocromos; el oxígeno por sí mismo es incapaz de hacerlo.

La citocromoxidasa es inhibida por el ácido cianhídrico (HCN) y por el ácido sulfhídrico (H_2S). Este enzimo ferroso es también bloqueado por el óxido de carbono (CO), tal como sucede con la hemoglobina. En este caso la unión del CO con el fermento respiratorio depende de la competencia entre el oxígeno y el óxido de carbono. La afinidad por el oxígeno es 5 veces mayor que por el óxido de carbono y por lo tanto se requieren concentraciones muy altas de CO para llegar a una inhibición efectiva de dicho fermento respiratorio. Esta inhibición sólo es posible en la obscuridad debido a que la luz intensa disocia el complejo formado por el CO y la citocromoxidasa.

Si relacionamos los citocromos por una parte con los ácidos C_4-dicarboxílicos, y por otra con el oxígeno resultan las siguientes reacciones:

$$\text{Succinato} + 2\ \text{citocromos oxidados} \xrightarrow[\text{succínica}]{\text{deshidrogenasa}} \text{fumarato} + 2\ \text{citicromos reducidos}$$

$$2\ \text{citocromos reducidos} + \tfrac{1}{2}\ O_2 \xrightarrow[\text{oxidasa}]{\text{citocromo}} 2\ \text{citocromos oxidados}$$

CUADROS DE RESUMEN DE LOS FERMENTOS QUE INTERVIENEN EN LA RESPIRACION TISULAR

A) **Deshidrogenasas:** activan el hidrógeno del substrato y lo transfieren a un transportador adecuado.
Deshidrogenasa ⇌ proteína específica + coenzimo.

1) **Anaeróbicas**

Nombre de la deshidrogenasa	Confermento	Substrato	Producto final
a) Succínica	Citocromo	Succínico	Fumárico
b) Málica	Coenzimo I	Málico	Oxalacético
c) Láctica		Láctico	Pirúvico
d) β hidroxibutírica		β -hidroxibutírico	Acetoacético
e) Triosafosfática		Triosafosfato	Fosfoglicerato
f) Cítrica	Coenzimo II	Cítrico	α ceto-glutárico

2) **Aeróbicas**

a) Uricasa		ác. úrico + $2H_2O + O_2$	Alantoína + CO_2 + H_2O_2
b) Xantin-deshidrogenasa		Hipoxantina ⟶ Xantina	Acido úrico
c) d-aminoácido-deshidrogenasa		d-aminoácido ⟶ iminoácido	α-cetoácido

B) **Oxidasas**: hacen posible la oxidación del substrato por el oxígeno libre.

Oxidasa	Substrato	Producto final
1) Citocromoxidasa	Citocromo a (red)	Citocromo a (ox)
2) Monofenoloxidasa (tirosinasa)	Tirosina + O_2	Melanina
3) Polifenoloxidasa (lacasa)	Adrenalina + O_2	Adrenocromo
4) Ascórbico-oxidasa	Acido ascórbico	Acido dehidroascórbico

C) **Peroxidasa**: transfiere oxígeno de los peróxidos a un substrato oxidable o a un aceptador de oxígeno. No se produce O_2 libre.

Fermento	Substrato	Producto final
Peroxidasa	Nitrito + H_2O_2	Nitrato + H_2O
	Pirogalol, Guayacol, Amidopirina, Bencidina + H_2O_2	Derivado pigmentado (fundamento de las reacciones características de los pigmentos sanguíneos)

D) **Catalasa**: descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. ($2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$)

E) **Desmolasas**: rompen las uniones entre los átomos de carbono. Como ejemplo tenemos la "descarboxilasa", que libera el CO_2 de la unión — C·COOH.

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH \longrightarrow CH_3 \cdot CHO + CO_2$$

Ac. pirúvico (forma cetónica) — Acetaldehido

MEDIDA DEL PODER OXIDO-REDUCTOR

Se puede estudiar cuantitativamente un proceso de óxido-reducción, que se realiza en la intimidad de una solución, colocando en vasos independientes la forma oxidada y la forma reducida. Si ambos recipientes se unen por medio de un puente electrolítico (solución saturada de KCl y gelatina) se establece entonces un contacto entre ambas, sin que ellas lleguen a mezclarse. En estas condiciones las soluciones no sufrirán alteración alguna, hasta que se las una por medio de un conductor metálico exterior. Este conductor permitirá el paso de los electrones de la forma reducida a la forma oxidada. Con este artificio se consigue establecer un flujo electrónico que puede medirse intercalando un instrumento adecuado; y como lo que caracteriza al proceso es el desnivel (diferencia de potencial) entre la forma oxidada y reducida es lógico utilizar como instrumento de medida un voltímetro; pero como la medida debe hacerse con gran precisión, y sin consumo de energía por parte del instrumento, se hace necesario emplear el método potenciométrico.

El alambre que une ambas soluciones termina en cada extremo en una plaquita de un metal inatacable (Au o Pt) las que se introducen en las soluciones.

Para poder establecer comparaciones entre los distintos sistemas óxido-reductores fué necesario elegir un potencial de referencia o de comparación. Tratándose de procesos de óxido-reducción pudo haberse tomado como punto de referencia el electrodo de oxígeno como el de hidrógeno, extremos entre los cuales deben realizarse dichos fenómenos. Se prefirió el de hidrógeno. Este electrodo de referencia está constituído por platino recubierto de negro de platino sumergido en una solución a pH $=$ O (cH $=$ l), la cual está saturada con hidrógeno. Se le llama **"electrodo normal de hidrógeno"**, asignándosele arbitrariamente un potencial igual a cero. Como este electrodo ofrece dificultades en su preparación, en la práctica se usa como referencia el electrodo de **"calomelano"**, cuyo potencial con respecto al "normal de hidrógeno" es a 18°C igual a 0.3377 Volts. El contacto entre la solución problema y el electrodo de referencia se hace por medio de un puente formado por una solución de KCl. Se elimina el oxígeno de la solución desconocida haciendo pasar a través de ella nitrógeno puro. El potencial se establece entonces en los extremos de la siguiente cadena:

Electrodo de platino	Sistema óxido-reductor (problema)	Solución saturada de KCl	Electrodo de calomelano

La medición se hace potenciométricamente, tal como se procede para la determinación electrométrica del pH. El valor encontrado depende de la relación entre la parte oxidada y reducida, como también del pH y de la temperatura.

La determinación del potencial de óxido-reducción es muy importante por ser este valor un índice exacto de la tendencia de un sistema a ser oxidado o reducido. Puede en un caso determinado variar simultáneamente el potencial de óxido-reducción y la acidez del medio, que también modifica el potencial. Esto obliga a medir al mismo tiempo el pH respectivo. Se verá más adelante, que también es necesario fijar la temperatura a la cual se ha hecho la determinación.

a) **Medición electrométrica.**—La existencia de potenciales eléctricos en una solución depende del desplazamiento de la siguiente ecuación, ya sea hacia la derecha o hacia la izquierda:

$$2H^+ + 2e \rightleftharpoons H_2$$

Si aumentan los iones hidrógeno (protones) en la solución, la reacción se desplaza hacia la derecha; los electrones abandonan el electrodo inerte (Pt) haciéndose este sitio más positivo. Si aumenta la presión del hidrógeno molecular (H_2) el desplazamiento se hace hacia la izquierda; los electrones son captados por el electrodo y el potencial se hace más negativo. La reacción H^+/H_2 (ión/gas) es la que determina el potencial en el electrodo.

En algunos casos se inicia la oxidación por la entrega de un protón (sucede esto con el ión H^+ de un ácido disociado) y el electrón puesto en libertad es captado por el aceptador adecuado. En otros, el aceptador capta simultáneamente el electrón y el protón (átomo de hidrógeno). La deshidrogenación se realizaría entonces en dos etapas:

1.º **liberación de protones** (liberación de H^+, tal como sucede en la disociación de un ácido), y

2.º **entrega de electrones** del radical R.

La reacción sería la siguiente:

$$RH_2 \rightleftharpoons R^{--} + 2H^+$$
$$R^{--} \rightleftharpoons R + 2e$$
$$\overline{RH_2 \rightleftharpoons R + H_2}$$

Los potenciales revelan equilibrios dinámicos y niveles energéticos; nada nos dicen acerca de las cantidades que reaccionan. La determinación de dichos potenciales sólo tiene importancia y significado cuando se trata de sistemas óxido-reductores reversibles. Las substancias que reaccionan deben dar productos estables y solubles en las condiciones de la determinación.

b) **Medición colorimétrica.**—Este procedimiento es de gran utilidad en Biología, especialmente en el estudio de los procesos oxidativos intracelulares. Rigen para él las mismas condiciones que para la determinación colorimétrica de pH. Los cambios de color, a pH constante, de los indicadores son debidos exclusivamente a los procesos de óxido-reducción, existiendo colorantes específicos para cada zona de potenciales.

Tabla N.º 1

Azul de metileno a pH=7.0 y a 30°C

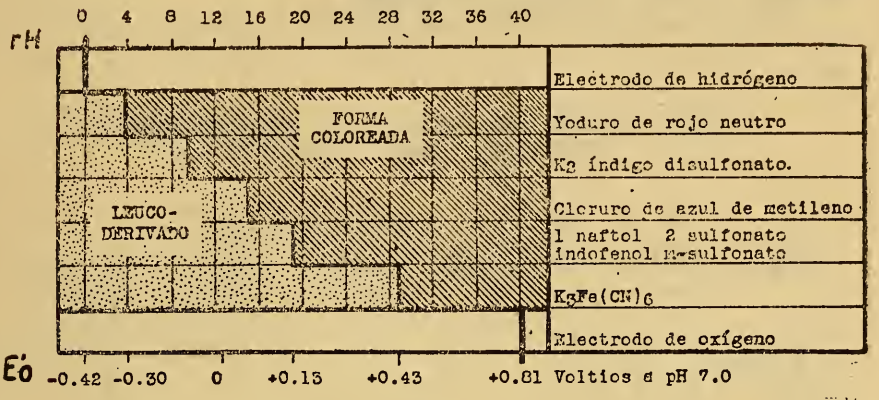
(según Stern)

% Oxidación	Potencial (E_h) mV	Color
2	-40	casi incoloro
5	-27	
10	-18	ligeramente
25	-3	azul
50	+11	
75	+25	claramente azul
90	+40	
95	+49	azul
98	+62	intenso

En la Tabla N.º 1 se puede apreciar la íntima relación entre el porcentaje de oxidación, los potenciales correspondientes, y el color del indicador azul de metileno (todo a pH = 7 y a 30°C).

Fig. 7

ZONAS DE VIRAJE DE ALGUNOS INDICADORES DE OXIDO-REDUCCION



La Fig. 7 muestra la zona de viraje de algunos colorantes; al mismo tiempo se indica el potencial y el rH correspondientes. Obsérvese además, que se pueden elegir indicadores adecuados para explorar cualquier potencial de óxido-reducción entre los límites representados por el hidrógeno y el oxígeno.

c) **El "rH".**—El símbolo "rH", creado por **Clark** a semejanza del pH, se refiere a "—log presión de H_2" o bien, rH = log $1/H_2$. La idea parece haber sido la de encontrar un símbolo exclusivo, que refleje con un solo número el poder óxido-reductor de una solución. Pero como este proceso depende también de las variaciones del pH, se pueden encontrar variaciones del rH aunque no haya variado el poder óxido-reductor, por lo cual es preferible —y así lo ha consagrado la práctica— expresar el poder óxido-reductor por el potencial, su pH y su temperatura correspondientes. Sin embargo, es posible la aplicación del símbolo rH en Biología, dado que el margen de variación del pH en condiciones fisiológicas es muy estrecho (7.3 y 7.5).

d) **Apéndice electroquímico.**—La expresión matemática que relaciona los factores que intervienen en los procesos de óxido-reducción se debe a **Peters**, y es la siguiente:

$$E = E_0 + \frac{0.060}{n} \log \left[\frac{Ox}{Red} \right]$$

donde

E = "potencial medido" experimentalmente.

E_0 = "potencial normal" del sistema de óxido-reducción (en relación con el electrodo de hidrógeno o sea a pH = 0) y que se refiere al potencial obtenido en el momento en que la forma oxidada (Ox) y reducida (Red) están en igual proporción (1:1 o 50% de cada una).

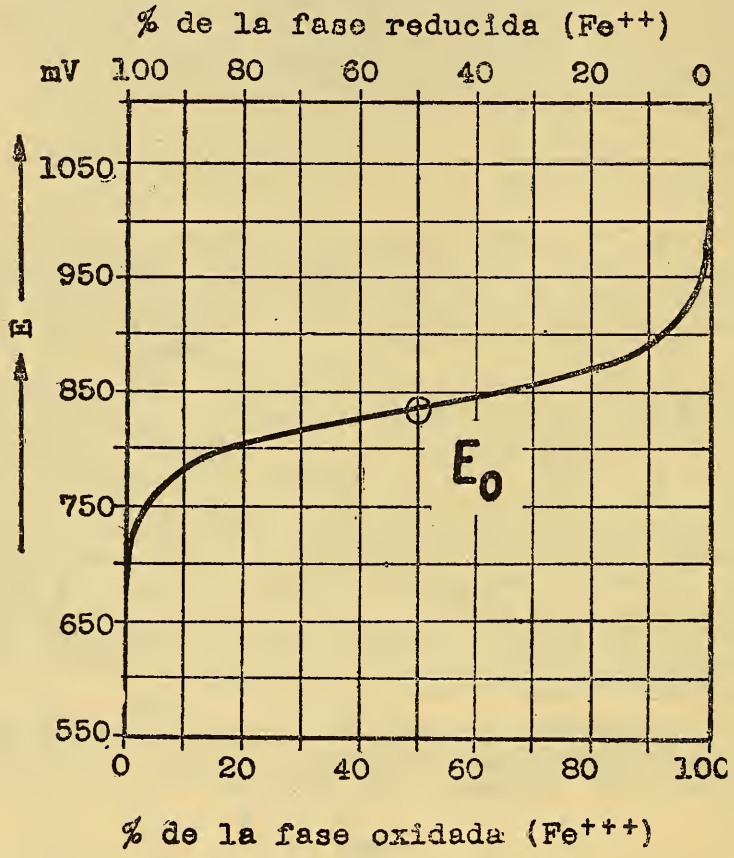
0.060 = una constante calculada para la temperatura de 30°C y que deriva del coeficiente RT/F de la ecuación original de **Nernst**, tomándose en cuenta también el factor de conversión de los logaritmos neperianos a logaritmos comunes.

n = número de electrones o hidrógenos transferidos en el proceso de óxido-reducción en estudio.

log = logaritmo común o de Briggs.

Fig. 8

POTENCIALES DE OXIDO DE REDUCCION DEL SISTEMA Fe^{+++}/Fe^{++}



La representación gráfica de esta fórmula da una curva característica para cada sistema. En la Fig N.º 8 se pueden apreciar en las ordenadas los potenciales (E) en milivoltios, y en las abscisas el porcentaje de la parte oxidada y reducida. La resultante de todas las determinaciones es una curva simétrica en forma de S itálica abierta. Cuando Ox = Red, es decir, cuando ambas están representadas en un 50%, el potencial medido (E) es equivalente E_0 porque el $\log \frac{1}{1} = 0$.

En Biología es interesante conocer el potencial característico E_0; a pH fisiológico el símbolo se transforma en E'_0. Al valor

correspondiente de E'_0 se agrega entre paréntesis el pH y la temperatura a la cual se hizo la medición.

Generalizando la ecuación anterior y haciéndola válida para cualesquier pH resulta la siguiente expresión para 30°C:

$$E = E'_0 + 0.03 \log \left[\frac{Ox}{Red} \right] - 0.06 \text{ pH}$$

Si se conoce el valor de E'_0, la relación entre Ox) y (Red) y el pH respectivo se puede calcular el potencial de óxido-reducción (E).

Tomaremos como ejemplo una solución de azul de metileno, cuyo pH sea de 7.45 y que se encuentre reducida en un 83%. El valor de E'_0 del azul de metileno a dicho pH y temperatura (30°C) es de + 0.431 Volts. Se reemplazan estos valores en la ecuación anterior y resulta:

$$E = 0.431 + 0.03 \log \frac{17}{83} - 0.06 \cdot (7.45)$$

$$E = 0.431 - 0.021 - 0.447$$

$$E = -0.037 \text{ Volts.}$$

RESUMEN: Los conocimientos fundamentales se encuentran reunidos en el esquema de **Ball** (Fig. 9), en el cual se puede observar que los distintos sistemas óxido-reductores funcio-

Fig. 9

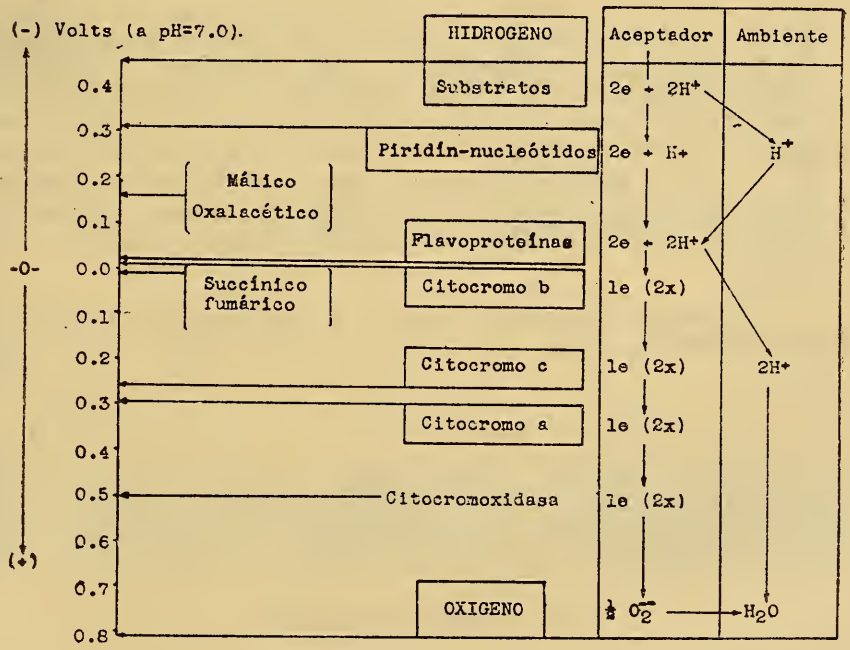


Tabla N.º 2

POTENCIALES DE OXIDO-REDUCCION

Sistemas	E'_o	pH'
HIDROGENO	-0.421	7.0
Hipoxantina-xantina	-0.371	7.0
Hipoxantina-ácido úrico	-0.410	7.24
Coenzimo I	-0.325	7.4
Glutation	-0.233	7.15
β-OH butírico-aceto-acético	-0.282	7.0
Cisteína	-0.227	7.15
Lactato-piruvato	-0.180	7.0
Riboflavina	-0.208	7.0
Málico-oxalacético	-0.169	7.0
Fermento amarillo	-0.059	7.0
Citocromo b	-0.04	7.4
Succínico-fumárico	-0.015	6.7
Hemoglobina	+0.152	7.0
Acido ascórbico	+0.1364	4.581
Citocromo c	+0.27	7.4
Citocromo a	+0.29	7.4
OXIGENO	+0.81	7.0

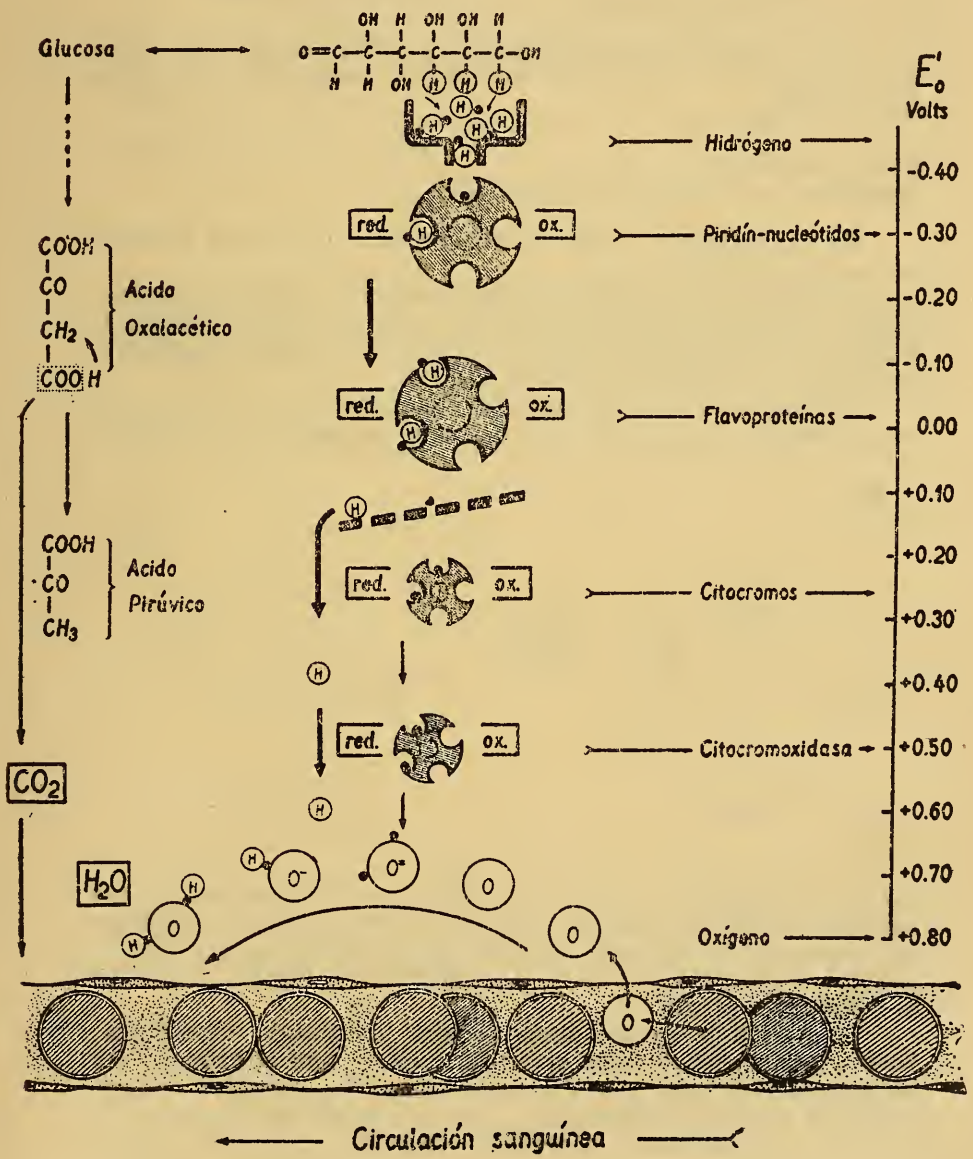
nan a diferentes niveles de potencial (véase también la Tabla N.º 2). Al mismo tiempo puede apreciarse que la transferencia del hidrógeno de una substancia a otra no se hace en forma de hidrógeno atómico, sino que los dos átomos de hidrógeno pierden dos electrones convirtiéndose en iones didrógeno (protones), que pasan al medio ambiente ($2H - 2e \longrightarrow 2H^+$). Estos iones H^+ se reunen finalmente con el oxígeno, que ha captado previamente ambos electrones ($O + 2e \longrightarrow O^{--}$), sólo entonces se forma el H_2O como producto final de todos los procesos oxidativos.

El modelo esquemático que va a continuación ilustrará lo anteriormente dicho.

Modelo esquemático de una oxidación biológica.

Liberación de energía en etapas y caída en cascada de hidrógeno y electrones hasta llegar al oxígeno, con formación de

(B. Günther y E. Poch, 1946)



En él se ha tratado de dar una imagen objetiva del aprovechamiento de la energía por etapas, comparándola con sistemas mecánicos dispuesto en cascada. La energía proviene de la caída de hidrógeno y de electrones, que se aprovecha en forma separada en la etapa de los citocromos. El desprendimiento continuo de iones hidrógeno y electrones pone en marcha las ruedas (sistema óxido-reductor reversible), entregando así una cierta cantidad de energía que se utiliza en el funcionamiento celular.

EXPERIMENTOS DE OXIDO-REDUCCION

Describiremos doce experimentos elementales que están relacionados con cada uno de los puntos discutidos en la exposición teórica.

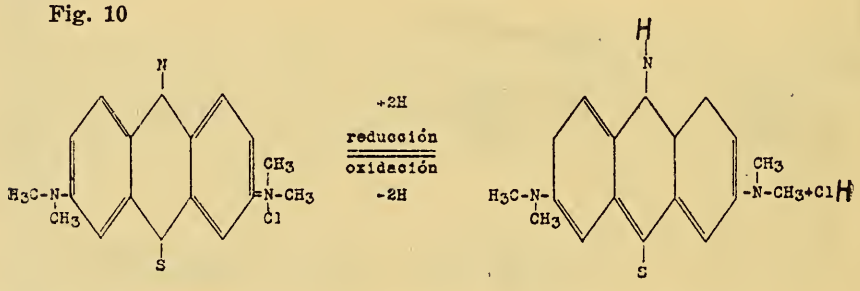
Experimento N.º 1.
Oxidación por remoción de Hidrógeno.

En dos tubos de ensayo se colocan 10 c. c. de azul de metileno al 0.5 por mil.

a) A uno le agregamos gota a gota una solución recientemente preparada de hidrosulfito de sodio al 0.5% ($Na_2S_2O_4$), hasta llegar justamente con la última gota a la decoloración; el otro tubo nos servirá de control.

Resultado: El líquido con azul de metileno se decolora; hemos obtenido el leuco-derivado del azul de metileno por reduc-

Fig. 10



ción con hidrosulfito. Se ve en la Fig. 10, que estas dos formas del azul de metileno difieren entre sí en dos átomos de hidrógeno. En caso de ser esto así (fenómeno de reducción), por el proceso contrario —esto es por oxidación— deberíamos obtener la substancia primitiva.

b) Agitemos en presencia de aire la solución decolorada; vuelve a aparecer el color azul. Está claro, que el primero era un fenómeno de reducción y el segundo uno de oxidación. Obsérvese que la acción del oxígeno tuvo por resultado remover dos átomos de hidrógeno de la molécula de azul de metileno. Hemos

demostrado así experimentalmente un caso de oxidación por pérdida de hidrógeno (deshidrogenación).

El experimento siguiente nos servirá para ilustrar un caso de oxidación por pérdida de electrones.

Experimento N.º 2.
Oxidación por transferencia de electrones.

Se toman dos tubos de ensayo y en cada uno se colocan 5 c. c. de agua destilada y dos gotas de cloruro férrico al 10%. A uno de los tubos se agrega 1 c. c. de solución de cloruro cuproso (ClCu) y en seguida a ambos, dos gotas de SCNK al 10%. En los dos tubos deberíamos obtener el color rojo característico de las sales férricas; sin embargo constatamos que la coloración aparece sólo en uno de ellos.

El tubo al cual se le agregó cloruro cuproso no da la reacción de las sales férricas.

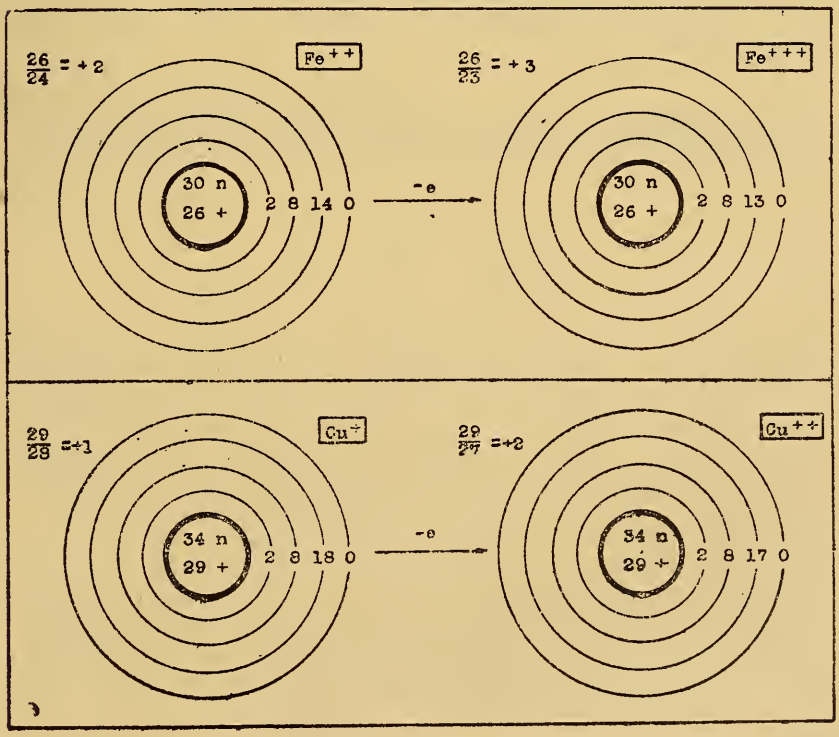
La reacción que se verifica en este caso es:

$$Cl_3Fe + ClCu \rightleftharpoons Cl_2Fe + Cl_2Cu$$

Desde un punto de vista electrónico lo que ha pasado es lo siguiente: el átomo de cobre metálico contiene en su envoltura 29 electrones, neutralizados por un número igual de cargas positivas que posee el núcleo. Si este átomo neutro pierde un

Fig. 11

OXIDACION POR PERDIDA DE UN ELECTRON



electrón, una carga positiva deja de estar neutralizada y tendremos el ión cobre monovalente. El ión cobre bivalente se obtiene por pérdida de un nuevo electrón, con lo cual quedan libres dos cargas positivas (Fig. 11).

El ión cuproso para transformarse en cúprico pierde un electrón. Es este electrón que pierde el cloruro cuproso el que va a neutralizar a una de las tres cargas que tiene el ión férrico, con lo cual éste queda con dos cargas positivas, en vez de las tres que tenía, y por consiguiente se transforma en ión ferroso.

$$Fe^{+++} + Cu^{+} \rightleftharpoons Fe^{++} + Cu^{++}$$

Se ve además, que el cloruro cuproso al reducir el cloruro férrico se oxida simultáneamente, pues de ión cuproso pasó a cúprico.

En el experimento anterior con el cloruro férrico hemos oxidado al cloruro cuproso. Veamos si esta sal férrica es capaz de oxidar también a otro sistema reducido.

Experimento N.º 3.

Transferencia de electrones al fierro, cromo y estaño.

Se prepara en un tubo el leucoderivado del azul de metileno y se reparte en tres tubos de ensayo:

a) Se agregan dos gotas de cloruro férrico; se obtiene la coloración azul. La misma oxidación que efectuamos con el oxígeno del aire la hemos obtenido por intercambio electrónico. Nos preguntamos ahora si esta propiedad es exclusiva del fierro, o si hay otros metales con los cuales se podría repetir este experimento.

Tabla N.º 3

POTENCIALES MEDIDOS CON ELECTRODO DE Pt Y REFERIDOS AL ELECTRODO NORMAL DE HIDROGENO (Según MICHAELIS)

Fase oxidada	Fase reducida	Temp. °C	Potencial E° en Volts
Substancias reductoras			
Sn^{++++}	Sn^{++}(NaOH)	18	-0.85
Sn^{++++}	Sn^{++}(HCl)	25	-0.43
Cr^{+++}	Cr^{++}	25	-0.40
V^{+++}	V^{++}	25	-0.20
Ti^{++++}	Ti^{+++}	18	+0.06
Cu^{++}	Cu^{+}	18	+0.18
$Fe(Cn)_6^{---}$	$Fe(Cn)_6^{--}$	25	+0.41
Fe^{+++}	Fe^{++}	25	+0.74
Hg^{++}	Hg^{+}	aprox.18	+0.92
Tl^{+++}	Tl^{+}	18	+1.21
Mn^{+++}	Mn^{++}	12	+1.51
Ce^{++++}	Ce^{+++}	17	+1.57
Mn^{+++}	Mn^{++}	12	+1.58
Mn^{++++}	Mn^{+++}	12	+1.64
Co^{+++}	Co^{++}		+1.76
Pb^{++++}	Pb^{++}	aprox.18	+1.8°
Substancias oxidantes			

b) A una solución de leucoderivado agregaremos una gota de bicromato de potasio al 10%; reaparece el color azul.

c) A otra muestra de leucoderivado agregaremos gotas de cloruro estánico; también reaparece la coloración.

Consecuencia: El experimento resulta con cualquier metal capaz de ofrecer cambios de valencia (véase Tabla N.º 3). Vamos a estudiar en un nuevo experimento cómo se efectúa esta oxidación.

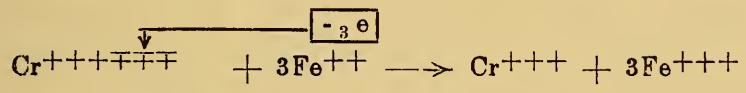
Experimento N.º 4.
Transferencia de electrones del fierro al cromo.

10 c. c. de solución reciente de sulfato ferroso al 5% se separa en dos tubos.

1) A 5 c. c. de esta solución se agregan dos gotas de SCNK al 2%, no hay coloración.

2) A los otros 5 c. c. se adicionan dos gotas de bicromato de potasio al 10% ($Cr_2O_7K_2$), acidificado con ácido sulfúrico, y se añaden también dos gotas de SCNK; hay cambio de color.

Resultado :Hemos transformado la sal ferrosa, que no da coloración con el sulfocianuro, en una sal férrica, que da una coloración roja con dicha substancia. La transferencia de electrones se hace de acuerdo con la siguiente ecuación:



Experimento N.º 5.—Influencia de la temperatura.

Veamos ahora la influencia de la temperatura sobre los fenómenos de óxido-reducción.

La ecuación de **Nernst** se puede aplicar a cualquier reacción de óxido-reducción reversible del tipo [Ox±n·e⇌Red] y toma la forma:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{Red}{Ox} \right]$$

donde [Ox] representa la concentración de la forma oxidada y [Red] la concentración de la forma reducida. Al observar la fórmula se puede ver, que al variar la temperatura T, quedando constantes los demás factores, debe variar el potencial E y por consiguiente el equilibrio del sistema debe desplazarse. Esto se puede demostrar mediante los siguientes experimentos:

A 10 c. c. de azul de metileno al 1 por mil se agrega 1 c. c. de NaOH N/10. Se calienta la solución casi a ebullición; en seguida se adiciona gota a gota una solución de glucosa al 1% hasta obtener por reducción la decoloración de las soluciones. Tenemos así en el tubo un sistema óxido-reductor muy sensible, desplazado ligeramente en el sentido de la reducción (leucoderivado). Es fácil constatar ahora, que basta enfriar el tubo,

sumergiéndolo en agua, para que reaparezca la forma oxidada azul. El fenómeno es reversible, y se puede hacer aparecer o desaparecer repetidas veces el color azul, calentando o enfriando el tubo. En la zona expuesta al aire la oxidación es acelerada por la presencia del oxígeno.

Experimento N.º 6.
Sobre la influencia de la acidez del medio (pH).

Los iones de H^+ al captar un electrón se descargan, quedando el H al estado molecular. A su vez, el hidrógeno molecular al transformarse en catión podrá reducir a otra substancia al cederle un electrón por cada átomo ionizado. Se produce así, según la ley de las masas, el equilibrio siguiente:

$$\frac{(H^+)^2 + (e)^2}{(H)^2} = K$$

Los iones de H^+ influyen pues directamente en la captación de electrones; por lo tanto, al variar su concentración (pH), el equilibrio de óxido-reducción se desplaza.

A 10 c. c. de solución muy diluída de fucsina (Rubin S) se agregan dos gotas de solución de NaOH N/10 y en seguida se calienta la solución. Después se agregan dos gotas de la solución de glucosa y se observará la decoloración. La solución se divide ahora en dos fracciones. Con el objeto de desplazar el pH hacia el lado ácido se agrega una gota de ClH/N y se obtiene la recoloración de la solución. A la otra fracción se agrega una gota de Cl_3Fe; reaparece también el color primitivo de la fucsina.

En ambos casos se llega a la oxidación de la fucsina reducida, debido a que el H^+ actúa como aceptador de los electrodos cedidos por la fucsina reducida; esta última se oxida (por pérdida de electrones) y el H^+ se transforma en H molecular.

Iniciaremos ahora los experimentos con material biológico.

Experimento N.º 7.—Demostración de oxidasa.

Se hace un corte reciente en una papa (solanum tuberosum). En la superficie se coloca una gota de tintura de guayaco (solución alcohólica reciente al 2%), que desempeña el rol de aceptador de oxígeno. Se observará en los bordes el color azul de la resina oxidada, coloración que progresa lentamente hacia el centro. Repítase el experimento con un trozo de papa hervido previamente durante algunos minutos; no se observará la oxidación.

Experimento N.º 8.—Existencia de peroxidasa.

En dos cortes de rábano se vierten algunas gotas de tintura de guayaco. En uno se deja caer una gota de H_2O_2; se observa instantáneamente el color azul y el desprendimiento de burbujas de oxígeno (esto último demuestra la presencia de una catalasa).

El trozo —con la tintura de guayaco solamente— no se modifica en su coloración (ausencia de peróxido orgánico sobre el cual podría actuar la peroxidasa).

El H_2O_2 no es capaz por sí solo de oxidar a la tintura de guayaco. Es interesante hacer notar, que la oxidación del guayaco también se consigue adicionando a la tintura algunas gotas de solución al 10% de Cl_3Fe. En este caso el Cl_3Fe hace las veces de aceptador de electrones; como se comprende es imposible realizar dicha oxidación con el Cl_2Fe.

Experimento N.º 9.—Presencia de catalasa.

En un tubo de ensayo se colocan trozos de papa finamente cortados. Se adicionan de 1 c. c. de H_2O_2, observándose un marcado desprendimiento de burbujas (oxígeno), debido a la presencia de una catalasa. Repítase lo mismo después de una breve cocción de los trocitos de patata; desaparece su propiedad de catalizador, por destrucción del fermento.

También en la sangre se encuentra una catalasa, que se puede demostrar aún a diluciones al 1 por mil de ésta. Si se añaden a 5 c. c. de sangre diluída diez gotas de H_2O_2 se observará un intenso burbujeo, debido al desprendimiento de oxígeno molecular.

Experimento N.º 10.
Demostración de una deshidrogenasa.
(Reacción de Schardinger).

En la leche fresca existe una aldehido-deshidrogenasa, cuya presencia se puede demostrar por medio del experimento siguiente:

Se dispone de dos tubos:

A.—5 c. c. de leche fresca + 0.5 c. c. de azul de metileno 0.4 por mil.

B.—5 c. c. de leche fresca + 0.5 c. c. de azul de metileno + 1 c. c. formaldehido 0.1 M. *.

Después de algunos minutos se observa decoloración en el tubo B. El azul de metileno se ha reducido y el aldehido se oxidó pasando a ácido fórmico.

$$(\text{Az. Met.}) + H_2O + HCHO = (\text{Az. Met.})\ H_2 + HCOOH$$

Se repite el experimento B hirviendo algunos minutos la leche; la reacción no se produce, con lo que se demuestra que el activador es una enzima.

---

* "La solución de formaldehido se obtiene tomando ¾ c. c. de formalina del comercio que se diluye hasta 100 c. c., y mediante gotas de solución de carbonato de sodio se lleva al pH 7.8".

A continuación y para finalizar, se demuestran las diferencias de potencial que se establecen entre una substancia oxidada y otra reducida. Para ello describiremos un sencillo experimento electrométrico de óxido-reducción.

Experimento N.º 11.
Demostración del potencial de óxido-reducción.

Se impregnan con una solución saturada de cloruro de potasio las paredes de un vaso de porcelana porosa; en seguida se llena éste con hidrosulfito de sodio al 5%. El vaso poroso lleno de hidrosulfito se sumerje en una solución de cloruro férrico al 10%. Las soluciones quedan así en dos compartimentos en buena conexión eléctrica, y sin mezclarse.

En cada uno de los compartimentos se introduce una lámina de oro (de 1 cm^2 de superficie) y que se conecta a un milivoltímetro (puede servir también un miliamperímetro suficientemente sensible). Se constata la existencia de un potencial, y el pasaje de corriente eléctrica.

Para una determinación exacta es indispensable el uso del método potenciométrico, con instrumental similar al que se usa para la determinación del pH.

BIBLIOGRAFIA

Bladergroen, W.—Chimie Physique Médicale. B. Wepf, Bâle. 1943. p. 333.

Fearon, W, R.—An Introduction to Biochemistry. C. V. Mosby Co., St. Louis. 1940. p. 325.

Green, D.—Mechanism of Biological Oxidations. Cambridge Biological Studies. Cambridge University Press. 1941.

Harrow, B.—Textbook of Biochemistry. W. B. Saunders Co., Philadelphia y London. 1943. p. 369.

Heilbrun, L. V.—Tratado de Fisiología General. Imprenta Universitaria de México. México. 1944. p. 367.

Kollath, W., Stadler, P.—Ergebn. Physiol. 1939, 41, 808.

Lenhartz, E.—Fisiología Química. Barcelona. M. Marín, 1942. p. 294.

Stern, K.—Oxidation-reduction potentials. En "Medical Physics". Edit. O. Glasser. The Year Book Publ., Chicago. 1944. p. 892.

MONOGRAFIAS ESPECIALES:

A Symposium on respiratory enzimes.—The University of Wisconsin Press. Madison. 1942.

Perspectives in Biochemistry.—Edit. J. Needham and D. Green. University Press. Cambridge. 1939.

Respiratory Enzymes.—Edit. Elvehjem and Wilson. Burgess Publ. Co. Minneapolis. 1940.