

# Contribución al estudio de las aplicaciones de los fermentos del *Cyperus esculentus*

por

F. Bustinza

En el laboratorio de Fisiología vegetal del Prof. Dr. Robert Chodat, de Ginebra, descubrí en 1928 en los tubérculos del *Cyperus esculentus* y también en otras ciperáceas (1), la existencia de un fermento, al que el citado Profesor designó con el nombre de *pseudo-peroxidasa*.

Dicho fermento transforma al p-cresol, en presencia del agua oxigenada, en un pigmento rojo, de naturaleza probablemente quinónica (2).

Sabido es que el agua oxigenada se utiliza para esterilizar la leche. En Alemania preparan la llamada *perhydrase-milch* (3). Durante el cursillo que seguí en la primavera del año 1936 sobre "Higiene y Bacteriología de la Leche", organizado por el Instituto Nacional de Sanidad, se me ocurrió la posibilidad de aplicar mi reactivo al diagnóstico del agua oxigenada en la leche. Hice por en-

(1) Robert Chodat et Florencio Bustinza "Sur la pseudo-peroxydase un nouveau ferment oxydant indirect, agissant par le moyen du peroxyde d'hydrogène." *Compte Rendu des seances de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève*, Vol. XLV, núm. 2, avril-juillet, 1928.

(2) F. Bustinza: "Contribución a l'étude des ferments du *Cyperus esculentus* L." *Bulletin de la Société Botanique de Genève*; vol. XXI, année 1929, y "Contribución al estudio bioquímico de la chufa", *Revista de la Real Academia de Ciencias de Madrid*, tomo XXIV, núm. 9 de la segunda serie.

(3) A. Böhme: "Nutrition experiments with perhydrase milk", *Deut. Med. Wochschr.*, 32, 1729-1733 (1906). Cita que tomo del trabajo de Harold R. Curran, Fred R. Evans and Abraham Leviton "The sporicidal action of Hydrogen peroxide and the use of crystalline catalase to dissipate residual peroxide", publicado en "The Journal of Bacteriology", septiembre 1940, vol. XL, núm. 3

tonces (el Dr. Garmendia, Jefe de la Sección de Análisis de Alimentos de dicho Instituto es testigo de ello) algunos ensayos, que tuve que interrumpir en el verano de 1936, y que no he podido reanudar hasta el presente año.

Como consecuencia de mis experiencias, puedo afirmar que mi reactivo permite apreciar claramente la presencia de agua oxigenada en la leche a la concentración de 1 gramo del hidróperóxido en 10.000 c. c. de leche, y que no es éste aún el límite de sensibilidad.

He partido para las diluciones de un perhidrol previamente valorado por mí con disolución valorada de permanganato potásico en medio sulfúrico.

Para practicar la prueba se ponen en un tubo de ensayo 5 c. c. de la leche a examinar; se le añaden 4 ó 5 c. c. de emulsión de chufas (1) recientemente preparada y 0,5 c. c. de disolución de para-cresol al 1 por 100 (empleamos el p-cresol Kahlbaum). Se agita un poco el tubo para mezclar bien y se deja en una gradilla. Al medio minuto ya se percibe la positividad de la reacción, y a los pocos minutos el producto lechoso, previamente blanco, ya ha adquirido tonalidad rosa, que llega a ser de un color rojo sangre cuando la concentración de agua oxigenada en la leche es superior al 5 por 10.000.

Nuestro reactivo (emulsión de chufas + p-cresol) permite, pues, investigar la presencia del agua oxigenada y su detección en la leche (2).

En marzo de 1941 he dado a conocer en la Real Academia de Farmacia la llamada reacción de Yoshida, que se utiliza en el Japón para el diagnóstico del grado de actividad del proceso tubercu-

---

(1) Empleamos chufas de la última cosecha, que maceramos 12 a 18 horas en agua para facilitar luego su trituración. Preparamos la emulsión machacando cinco chufas en un mortero y agregando luego 10 c. c. de agua destilada y prosiguiendo la trituración hasta obtener una buena emulsión, que enseguida filtramos a través de un poco de algodón colocado en un embudito.

(2) La emulsión de chufas, por su contenido en peroxidasas, puede también utilizarse para demostrar la presencia del agua oxigenada en la leche, recurriendo a las reacciones propias de las peroxidasas, pero esta es una prueba que aunque no se ha dado a conocer como aplicación de las peroxidasas de la chufa, tiene el mismo fundamento que la reacción que se ha utilizado ya para diagnosticar el agua oxigenada en la leche, utilizando las propias peroxidasas de la leche si está cruda o las peroxidasas de la patata blanca o de la patata rosa, de la salvia, etc. Véase Fouassier: "Investigation de l'eau oxygénée dans le lait pasteurisée". Journal de Pharmacie et de Chimie, 7 me., serie 22 (1920), p. 33-34.

loso. En dicha reacción se utiliza como antígeno la vacuna A — O número 1, preparada por el Instituto Arima, de Osaka. Dicha vacuna está preparada a partir de bacilos de Koch desprovistos de su envoltura céreo-lipoidea, estériles, y según su descubridor (el Profesor Arima), absolutamente desprovistos de acción patógena.

En el folleto que primeramente consulté acerca de dicha vacuna (A - O a specific tubercle bacilli preparation, an explanation and a guide for its use" (publicación del Arima Institute de Osaka), se dice en la página 3, refiriéndose, claro está, a la citada vacuna: "it is treated with an antiseptic (no especifican con cuál) in accordance with the regulations of the Japanese Government". En el citado folleto también se afirma que parte de los protoplasmas bacilares han experimentado un proceso de autólisis, y esto me indujo a adicionar a dicha vacuna mi sistema emulsión de chufas, p-cresol y agua oxigenada, para tratar de comprobar dicha autólisis indirectamente por la presencia de amino-ácidos (véase al final del presente trabajo).

Agregué a 2 c. c. de vacuna, 1 c. c. de emulsión de chufas, 0,5 c. c. de la disolución de p-cresol al 1 por 100 y unas gotas de  $H_2O_2$  al 1 por 100. Dispuse como control otro tubo con idénticas sustancias, pero en el cual la emulsión de chufas había sido previamente hervida, y otro tubo con la vacuna + emulsión de chufas no hervida + agua oxigenada (es decir, sin p-cresol), y observé que obtenía también coloración roja, aunque más débil, en el tubo al cual no había yo adicionado el p-cresol.

¿Sería el p-cresol el antiséptico utilizado por los investigadores japoneses? Lo consideré poco probable y pensé en el ácido fénico. Entonces... ¿el ácido fénico también da reacción positiva con la emulsión de chufas activa + el agua oxigenada? En efecto: preparo una disolución de ácido fénico al 1 por 100 y otra al 0,5 por 100, y las dos disoluciones me dan reacción positiva, más intensa la primera que la segunda, y ambas menos intensas que la que se obtiene con el para-cresol (1).

La certeza absoluta de que, en efecto, el Prof. Arima emplea el ácido fénico en su vacuna, la adquirió algún tiempo después,

---

(1) Hay que dilucidar, si es el mismo, el fermento que actúa sobre el para-cresol y sobre el fenol, pues en la emulsión de chufas hay peroxidasa y pseudoperoxidasa.

cuando recibo del Instituto Arima el folleto "Erklärung für das Tuberkulosevakzin A-O und seine Gebrauchsanweisung" en cuya página 3 se dice así: "Die Sterilität des A-O ist tierexperimentell und auf Grund seiner Kultivierung garantiert. Ausserdem wird das AO nach dem japanischen "Gesetz für die Herstellung von bakteriologischen Präparaten" mit *Karbolsäure* versetzt.

También he comprobado con la emulsión de chufas y el agua oxigenada la presencia de ácido fénico en una muestra de vacuna anti-tifoparatifoidea del Instituto Nacional de Sanidad, vacuna preparada emulsionando los gérmenes en suero salino fenicado (8,5 gramos de CINa en 1.000 c. c. de disolución al 0,5 por 100 de ácido fénico).

Resultado de mis experiencias, puedo afirmar que con mi reactivo (emulsión de chufas + agua oxigenada) puedo evidenciar la presencia del ácido fénico en una vacuna, siendo la reacción, al menos a las diluciones a que se emplea el ácido fénico en las vacunas, más acusada que la que proporciona el cloruro férrico.

Numerosos microbios, algunos de los cuales pueden albergarse en el tramo intestinal, son capaces de producir a expensas de la tirosina (amino-ácido procedente del desdoblamiento de las proteínas), p-cresol y ácido fénico, fenoles cuya abundancia puede servir como índice de la actividad de dichas bacterias en los medios en que viven (medios de cultivo, contenido intestinal). La dosificación de fenoles en las heces permite apreciar el grado de las putrefacciones intestinales (1).

Como mi reactivo permite investigar la presencia del p-cresol y del ácido fénico, se me ocurre que puede servir para la dosificación de dichos fenoles en las heces (2). En efecto, adicionando a heces normales distintas cantidades de dichos cuerpos, consigo con mi reactivo matices de coloración rojiza de intensidad proporcional a las dosis empleadas. El descubrimiento de una nueva técnica de

---

(1) Las técnicas que se siguen corrientemente para la dosificación de fenoles en heces son: la de Folin y Denis o la de Goiffon-Mme. Jonckheere-Debergh. Véase R. Goiffon: "Manuel de Coprologie Clinique", 1935, págs. 116-118.

(2) No hemos estudiado aún la acción de nuestro reactivo sobre el indol (producto que se origina a expensas del triptofano por la acción de diversos microbios, principalmente del coli-bacilo) y cuya proporción en heces refleja también el grado de putrefacción intestinal, pero al decir de Goiffon—loco citato, pág. 119—, los datos que suministra el índice de indol en heces son menos interesantes y menos instructivos que los aportados por la cifra de fenoles.

dosificación de fenoles en heces, basada en estos hechos, presenta entre otras dificultades la de que empleando una emulsión lechosa para practicar la reacción, no se puede utilizar el colorímetro para la dosificación de fenoles por colorimetría por transparencia y por comparación con una disolución tipo de p-cresol. Confiamos, no obstante, poder llegar a resolver esa y otras dificultades y poder hallar un nuevo método analítico cuantitativo para fenoles en heces.

La determinación de fenoles en la sangre presenta interés, pues la hiperfenolemia puede presentarse en aquellos procesos de putrefacción intestinal en los cuales los fenoles absorbidos en el intestino y que han pasado a la circulación sanguínea, no son bien eliminados por la orina (ya libres o conjugados) a consecuencia de trastornos funcionales renales.

Sabido es el interés que ofrece la práctica de la reacción xantoproteica de Becher en sangre (1), pues su intensidad refleja el grado de insuficiencia renal.

Pues bien: considero que es factible aplicar mi reactivo a la dosificación de fenoles en el suero sanguíneo, pues en los ensayos previos que he efectuado adicionando p-cresol o fénico al suero en distintas proporciones, hallo matices de coloración con mi reactivo que son proporcionales a la cantidad de fenoles adicionados. Por idénticas razones se podrá revelar la presencia de fenoles en la orina (me refiero, claro está, por ahora, al para-cresol y al fenol) con mi reactivo, y su identificación no sólo interesa para deducir la forma como elimina el riñón las substancias de naturaleza fenólica producidas en la putrefacción intestinal, y que han pasado a la sangre, sino también en aquellos casos especiales en que aparece el fenol en la orina (envenenamiento por ingestión o por haberse absorbido a través de la piel por empleo de curas externas fenicadas).

Si consigo resolver la dosificación cuantitativa de fenoles en las heces utilizando mi reacción, creo será después fácil hallar la técnica para la misma dosificación en suero y en orina.

No terminan aquí todas las posibilidades de aplicación analítica de la emulsión de chufas. La evolución (descubierta por mí en Ginebra) del pigmento rojo obtenido con la emulsión de chufas, para-

---

(1) Erwin Becher: "Harn und Blutuntersuchungsmethoden", 1937, pág. 47, "Die xanthoproteinreaktion im enteiweissten Blut nach Becher".

cresol y agua oxigenada en presencia de amino-ácidos, en otro pigmento el llamado *cresol-azur* (1), azul con fluorescencia dicróica (colores azul y rojo), que en presencia del ácido acético se deja extraer por el alcohol amílico dando un fuerte dicroísmo, es la base para una nueva reacción de diagnóstico de amino-ácidos, y en este aspecto, las posibilidades de aplicación de nuestro reactivo han de ser variadisimas, y de su estudio nos ocupamos actualmente.

Laboratorio de Fisiología Vegetal, 31-XII-41.

---

(1) El *cresol-azur* había sido obtenido con anterioridad por el Prof. Dr. Robert Chodat y colaboradores utilizando la tirosinasa (que no necesita la presencia del hidro-peróxido para su acción) sobre el p-cresol y diversos amino-ácidos. Para bibliografía, consúltese mi trabajo "Presencia de tirosinasa, oxidasa y catalasa en las raíces de *Inula helenium*, *Achillea santolinoides* y *Achillea millefolium*". *Reseñas Científicas de la Sociedad Española de Historia Natural*, tomo VI, 1931.