

Excmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores,

Iniciamos esta intervención afirmando que considero un gran honor para esta Real Academia recibir hoy como Académico de Honor al Profesor Manuel Losada Villasante, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Real Academia de Medicina de Sevilla. Es así mismo Académico Fundador de la Akademie für Umweltfragen de Alemania y de la Academia Sevillana de Ciencias, pero, es, sobre todo, un destacado docente-investigador que ha dedicado toda su vida a la Ciencia y a la Universidad y además un buen y admirado amigo.

En este acto debemos subrayar que la Real Academia de Farmacia con ocasión de la Junta General Extraordinaria de fecha 17 de diciembre de 1998 y la preceptiva reunión anterior de la Comisión de Admisiones, aprobó en base a sus grandes méritos la designación del Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante como Académico de Honor de esta Real Academia cosa que conociendo su trayectoria científica y académica nos satisface extraordinariamente y sobre todo, nos congratula recibir en esta Real Academia a tan digno miembro.

Para seguir esta trayectoria académica, científica y social del Profesor Manuel Losada hemos pensado que tal vez resultaría útil dividir en varias partes este relato. En primer lugar haremos referencia a los aspectos académicos y científicos del nuevo Académico de Honor desde el punto de vista de sus pasos universitarios, y forzosamente tenemos que hacer referencia a 1947 cuando nos conocimos y coincidimos en la Universidad de Madrid en los estudios de la Licenciatura de Farmacia con tantos compañeros y amigos como Avelino Pérez Geijo, Gonzalo Giménez Martín, Manuel Ruiz Amil, José Antonio Cabezas, José María Recio, Eugenio Laborda, María Rosa Villarejo, Ra-

mona Beltrán, Carmen Alvarado y tantos otros colegas con los que competíamos y disfrutábamos de la amistad de compañeros de curso y de esa siempre recordada vida académica universitaria. Y ya en esos tiempos 1947-1952 Manuel Losada era un compañero y amigo de referencia, el más brillante del curso, el que al final de los estudios iba a ser por derecho propio Premio Extraordinario de Licenciatura y Premio Nacional Fin de Carrera (1952) y más tarde Premio Extraordinario de Doctorado de la Facultad de Farmacia (1956) de la Universidad de Madrid.

Una vez concluido el Doctorado y siempre bajo la sabia orientación del Profesor José María Albareda, que le apreciaba muchísimo, inicia su caminar por los grandes centros de investigación en el extranjero, primero en la Universidad de Munster, Alemania (1954-55), y más tarde en los famosos Laboratorios Carlsberg, Dinamarca (1956-1957), para, después obtener plaza de Colaborador Científico del CSIC, pasar al Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos (1958-59). Es entonces cuando es nombrado "Research Biochemist", en el Departamento de Fisiología Celular en la misma Universidad de California (1959-60) en fructífera colaboración con el Profesor Daniel Arnón, del que iba a disfrutar de gran aprecio y amistad personal. Es esta una fase sumamente productiva y de gran relieve científico como luego mencionaremos.

En épocas posteriores sería nombrado Investigador Científico (1962-67) y Profesor de Investigación del CSIC. En 1967 se traslada a Sevilla, ciudad en la que enlazando con Madrid, iba a desarrollar su extraordinaria trayectoria científica como catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (1967-86), aunque ya en 1964, en Madrid, había sido nombrado Director del Instituto de Biología Celular (1964.67), Instituto de nueva creación en el Centro de Investigaciones Biológicas en el que se integraban los grupos dirigidos por los Profesores Gonzalo Giménez Martín y Julio R. Villanueva, centro que iba a marcar pautas de desarrollo investigador y altos niveles de producción científica dentro del CSIC.

A los Premios de Licenciatura y de Doctorado ya mencionados, pronto se iban a unir un amplio número de distinciones y reconoci-

mientos; La Encomienda de la Orden de Alfonso X el Sabio (1964) del Ministerio de Educación y Ciencia, el Primer Premio Nacional del CSIC (1965), el Premio Nacional del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (1975). Se le nombra después Hijo Predilecto de su localidad natal, la Ciudad de Carmona (1966), se le concede la Medalla de Oro "SADRYM" a la Investigación (1976), el Premio Nacional de Investigación en Biología (1977), La Medalla de Honor al Fomento de la Invención de la Fundación García Cabrerizo (1984), la Medalla "Gerónimo Forteza" del Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia (1985), el Primer Premio de Investigación Científica y Técnica "Maimoinides" de la Junta de Andalucía (1988), el Primer Premio a la Investigación "Rey Jaime I" (1990). Más tarde se le nombra Hijo Predilecto de Andalucía (1993), se le concede el Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica (1995) y se le distingue más tarde con el Doctorado Honoris Causa por la Universidad Pública de Navarra (1997).

También merece la pena destacar un conjunto de distinciones que le acreditan como científico y docente eminente tal como al principio hemos mencionado, como son el ser elegido Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (1966), Consejero del Consejo Nacional de Educación (1968), Académico Numerario de la Real Academia de Medicina de Sevilla (1979), Miembro del Instituto de Ciencias del Hombre, Madrid (1985), Académico Fundador de la Academia Sevillana de Ciencias (1968), de la Academia Europea de Biología (1986), y de la Academia Iberoamericana de Farmacia (1992).

Merece así mismo la pena recordar como su prestigio y reconocimiento científico vienen acreditados por los nombramientos como Miembro de los Comités Editoriales de las Revistas más destacadas de su especialidad como *Plant Science Letters* (1972-77), *Photobiochemistry and Photobiophysics* (1979-87), *Photosynthesis Research* (1980-82) y *Physiologia Plantarum* (1980-82). Es además elegido miembro de destacadas sociedades científicas internacionales como el California Chapter of Sigma Xi (1961), Sociedad Española de Bioquímica (1964), American Association for the Advancement of Science (1967), British Biochemical Society (1968), American Society of Plant Physiology (1968), British Photobiological Society (1970), French Société de Chimie Biologique (1971), Japanese Society of Plant

Physiology 81971), Sociedad Española de Fisiología Vegetal (1974) e International Bioelectrochemical Society (1983).

En el capítulo de subvenciones a la investigación disfruta de ayudas económicas altamente significativas como de los National Institutes of Health, Fundaciones Juan March, Manuel Aguilar, y FOCUS, de la empresa Dragados y construcciones, Fondo Nacional de Ayudas a la Investigación, Laboratorios Lepetit de Italia, Junta de Energía Nuclear, Comisión Asesora de Investigación, Frontiers of Science de la National Science Foundation de los Estados Unidos, Centro de Estudios de la Energía del Ministerio de Industria y Energía, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, etc.

En la segunda parte de este relato nos centraremos en los aspectos más relacionados con las líneas de investigación y los resultados más relevantes de su trayectoria científica y en especial, en lo que se refiere a los estudios sobre la Bioconversión de la energía solar y la Bioenergética, campos en los que el grupo del Prof. Losada ha llevado a cabo excelentes contribuciones tal como se aprecia en el amplio número de publicaciones realizadas, mayormente en revistas científicas y revisiones de prestigio internacional. Por todo ello, nos parece oportuno mencionar algunos de los enfoques de investigación comenzando por la asimilación fotosintética del nitrato, con especial atención a la ruta del metabolismo, enzimas envueltas y regulación, sin olvidar un concepto unificado de transducción de energía por los sistemas bioquímicos destacando por lo que se refiere a la energía luminosa, redox, ácido-base y de enlace fosfato. Interesa destacar los trabajos orientados a aclarar la doble función tanto redox como ácido base del oxígeno en bioenergética y las investigaciones posteriores sobre el mecanismo de transducción de energía de citocromos de tipo b en cloroplastos y mitocondrias. De especial interés ha sido asimismo los trabajos sobre glicolisis y gluconeogénesis en levaduras dedicando especial atención a las enzimas y los procesos de regulación.

Otro campo enormemente productivo ha sido el relacionado con la fotoproducción de amoníaco y de peróxido de hidrógeno por sistemas fotoquímicos y fotobioquímicos. Por último, mencionar las investigaciones desarrolladas en épocas más recientes orientadas a la selección y aplicación de algas verde-azuladas fijadores de nitrógeno para la fotoproducción de biomasa de alto contenido en proteína, con

definidas aplicaciones biotecnológicas y que han representado apoyos especiales de grandes empresas interesadas en estos campos más aplicados.

Nos queda por último subrayar las actividades más relacionadas con las funciones universitarias de formación de jóvenes investigadores en donde se puede destacar la dirección de más de 50 tesis doctorales y las contribuciones encaminadas a la formación de más de 100 investigadores, un buen número de ellos ocupando posiciones destacadas tanto en el ámbito del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, como de los diferentes departamentos universitarios distribuidos por toda la geografía española. Además no sería fácil enumerar la elevada cantidad de congresos y simposios nacionales e internacionales en los que el Prof. Losada ha sido invitado a pronunciar conferencias o desarrollar ponencias sobre temas relacionados con su especialidad sin olvidar el elevado número de centros de investigación y universidades prestigiosas de ámbitos internacionales en los que su presencia ha sido importante especialmente como conferenciante principal.

No quisiéramos terminar esta exposición sin hacer referencia a la elevada cifra de trabajos de investigación y revisiones publicadas así como de varios libros científicos y de cinco libros de texto, el más reciente el titulado "Los elementos y moléculas de la vida", que según nos ha referido el autor constituye en cierto modo la obra y el sueño de su vida. Por último el Dr. Losada ha sido solicitado por su prestigio como traductor del inglés de varios artículos científicos además de cuatro libros de texto, uno de ellos en el que ha colaborado con nosotros el más conocido por su amplia difusión internacional "The Microbial World" escrito por el renombrado y reconocido profesor de la Universidad de California, el Profesor Roger Y Stanier, uno de los bioquímicos microbianos más sobresalientes de la segunda mitad de nuestro siglo. Esta obra ha sido ampliamente utilizada tanto en las Universidades españolas y en las iberoamericanas. De hecho la versión original ha sido traducida a nueve idiomas, incluido el chino y el japonés.

También, nos parece oportuno incorporar algunas opiniones de un antiguo alumno y posteriormente colega como catedrático de Ecología en la misma Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de

Sevilla. Nos referimos al Profesor Francisco García Novo, buen amigo nuestro y colaborador en diferentes instancias y jurados de premios que nos manifestó su aprecio y admiración por el Profesor Losada. En conversación entrañable nos contaba como nada más llegar a la Facultad de Ciencias de Sevilla, comienza a organizar en un pasillo y más tarde en unos aseos un núcleo de ciencia dura que ensancharía pronto los horizontes de la Bioquímica y la Fisiología Vegetal Sevillana.

Para alcanzar este propósito, trae del CSIC a su colaboradora más valiosa, su esposa Antonia Friend, que organiza un entorno habitable, desarrolla la administración y prepara los elegantes manuscritos que fluirán progresivamente de este laboratorio, presentando una cadena continuada de descubrimientos sobre la fotosíntesis, desde el nivel químico al más profundo de la biología molecular. Desde los primeros momentos, junto a Losada se encuentra un gran colaborador científico procedente también del CSIC: el Dr. Antonio Paneque, con el que se logran los primeros éxitos de la unidad sevillana.

Las enseñanzas de la Licenciatura de Biología se habían autorizado en 1965 sin que existiera cuadro de profesores. Y Manuel Losada pertenece a la primera generación que llevará también a Sevilla al zoólogo Salvador Vicente Peris, al botánico Emilio Fernández-Galiano, al microbiólogo Enrique Montoya. Este núcleo actúa como un "atractor" y a golpe de gestiones administrativas y convicción, incorpora a Fernando González Bernáldez, Jorge López Sáez, y jóvenes (¡entonces!) doctores españoles realizando su especialización en centros de excelencia de varios países: Enrique Cerdá en Stanford, Benito Valdés en Liverpool, García Novo en St. Andrews. En 1970 la Facultad de Biología disponía ya de un excelente equipo docente que innovaría radicalmente la enseñanza de la Biología.

Así nos refería García Novo el desarrollo docente: "Losada había ganado una Cátedra y comienza a impartir la docencia de Bioquímica para Biólogos en el Aula IV de la Facultad de Ciencias, aula grande, con el suelo en pendiente, con tarimas de madera, grandes encajados de cristal pintado de negro al gusto de la época. El aula no, pero la enseñanza de la Bioquímica que imprime Losada, suena a nuevo. A discusión de resultados recientes, a incorporación de artículos a las clases, a exploración. A Ciencia que se crea y rehace de año en año.

A investigación en primera persona. Y las prácticas no se parecen a las rutinarias de otras materias, con equipos de museo, aplicando la "ley de los resultados forzosos" para obtener lo que se supone que debería observarse".

Por el contrario, las prácticas de Bioquímica son como estancias breves en un laboratorio de investigación, donde se interrumpían por un rato los experimentos para atender a los alumnos. Todavía más, para incorporarlos al trabajo experimental. Era importante el uso de los espectrofotómetros, el Warburg, los pHmetros. ¡Cuántas averías causadas por manos inexpertas paralizaban la investigación!.

Se construye la asignatura de Bioquímica desde la frontera del conocimiento. Las prácticas reproducen experimentos recientes de la bibliografía. Se trabaja con reactivos nuevos que apenas hace unos años se habían comprendido químicamente. Son años cruciales en la Bioquímica mientras se produce la eclosión de la Biología Molecular, que en la Universidad de Sevilla, arraiga con vigor.

Este deslumbrante panorama científico atrae los primeros colaboradores: Miguel García Guerrero, Jacobo Cárdenas, Pedro Aparicio, José María Vega Piqueras, Carlos Gómez Moreno, Francisco Castillo, José María Maldonado, Miguel Ángel de la Rosa, Joaquín Herrera, Juan López Barea, María Tortolero, Alicia Chamarro, Pedro Candau, Francisco Sosa, que configuran un equipo poderoso. A los diez años de llegar a Sevilla, en 1975 la calidad del departamento es refrendada por la Sociedad Española de Bioquímica que celebra en Sevilla su VI Congreso, al que asisten 5 Premios Nobel. Fue el primer congreso masivo de la especialidad, con centenares de comunicaciones, presentaciones simultáneas y posters.

En 1998 se ha celebrado un nuevo Congreso en el Departamento de Bioquímica, en su nueva sede de la Cartuja, al que tuvimos el honor de asistir. Más científicos, más invitados, más posters y conferencias. Todo apuntaba hacia una excelente organización. Pero el de 1975, había sido la "presentación en sociedad" del grupo de Losada, en la Universidad de Sevilla. En el último Congreso el Prof. Losada recibió la Medalla de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Como Director de su grupo, Manuel Losada ha tenido lo que él mismo califica de "olfato" científico. No sigue con el Carbono de su

maestro Arnon, sino que se enfoca hacia el Nitrógeno, y se atreve a denominar los procesos de reducción “fotosíntesis del N nítrico” anticipando una generalización del significado de la fotosíntesis a la que contribuirá de modo destacado. Tras el NO_3 , será el NO_2 , el SO_4 y finalmente el N_2 lo que llamará su atención. Los metales y coenzimas presentes en este proceso. Para estudiarlos con finura abandona su material de elección durante años, las hojas de espinaca, que diariamente entraban en una escala propia de una frutería, en el laboratorio. Toman la alternativa los cultivos de algas y poco a poco una aproximación más cercana a la biología molecular, cuyos métodos aplica. Todo ello desemboca en estudios del genoma, por el lado más profundo de los seres vivos. Y en los ecológicos, estudiando los microorganismos extremófilos, por el lado más amplio.

En el laboratorio ha sido capaz de identificar entre los estudiantes a los magníficos científicos del futuro. Los calificaba de “mirlos blancos”. Así subrayaba García Novo la obra realizada: “He tenido el privilegio de conocer, también como alumno, a muchos de ellos y me causa admiración la intuición para seleccionarlos y la habilidad para captarlos. Los que pertenecíamos a otras áreas nos quejábamos de esta competencia con Losada por los mejores alumnos de cada promoción. Y subraya García Novo, afortunadamente para la Ecología, existen biólogos que prefieren el contacto con la Naturaleza a su “desintegración” en el tubo de ensayo. Más tarde, el Profesor Losada pone de manifiesto la capacidad de orientarlos en una Tesis prometedora, enviarlos a centros de excelencia donde completar su formación y crear así generaciones de excelentes investigadores y profesores, que han enriquecido el panorama de la Bioquímica y la Fisiología Vegetal en España. El libro “Manuel Losada Maestro de Científicos”, dedicado por sus discípulos en la Universidad de Sevilla, con ocasión de la concesión del Premio Príncipe de Asturias en 1995, expresa esta realidad vigorosa y auténtica.

Posiblemente no sucede esta selección al azar: Tiene que ver con algunos rasgos del carácter de Manuel Losada que se reflejan en el aula y en el laboratorio. Es tenaz, es clarificador, sabe concentrar absolutamente su esfuerzo. Y transmite este valioso modo de ser a sus alumnos y a sus discípulos.

Según muchas generaciones de alumnos, Manuel Losada explica con sencillez, y notable claridad. No se queda en los números, las me-

didadas, las masas, las hace comprensibles: al hablar del contenido de Fe de nuestro organismo, lo materializa con un clavito. Explica el watio y lo hace con el llavero, dejándolo caer y elevándolo. Explica el kilowatio refiriéndose a la masa de una persona en nuestro campo gravitatorio que sube una altura en un tiempo. No son números vacíos, medidas imaginarias, conceptos para memorizar. Son realidades accesibles. Siempre.

Con frecuencia a sus colaboradores en la docencia les insistía: “No tratéis de explicar a los alumnos una cosa que no entendéis. Hay que concentrarse en los problemas y darles muchas vueltas”.

Y proseguía García Novo con la mayor admiración y respeto: He sido testigo de excepción de este procedimiento que él ha practicado consigo mismo durante décadas y que lo ha llevado a una reformulación de las expresiones comunes en los libros de texto de la Bioquímica que han culminado en su gran texto. Cualquier concepto lo ha explorado, analizado, examinado en otros textos, españoles, ingles, alemanes. Lo ha desmenuzado hasta hacerlo transparente, y a partir de ahí, ha construido sobre él. ¡Cuántas veces he tenido ocasión de discutir con el autor el mecanismo de acción de la Nitratorreductasa o la Nitrogenasa, la bomba de protones y la permeabilidad de la membrana, el mecanismo de ruptura del agua en la fotólisis y el radical $O^{\cdot-}$, la acumulación de energía en los enlaces Fosfato!.

El Profesor Losada vive con pasión la investigación científica: Es un entusiasta de su ciencia, de su tema y no hay ocasión inadecuada para ello. En la cafetería, en un pasillo, tras una reunión académica, hace saltar la conversación científica, sin los pudores que a veces atenazan a los universitarios. En muchas ocasiones hemos sido testigos de sus intervenciones y discusiones, frecuentemente acaloradas, por ejemplo, con el siempre recordado gran investigador Alberto Sols en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. A decir verdad, los dos científicos eran ciertamente vehementes en sus discusiones científicas y en sus comentarios.

En un paso más, se ha interesado por el devenir histórico, no por las peripecias vitales de los personajes sino por la emergencia de los conceptos que acuñaron Dalton, Lavoisier, se interesa por los primeros pasos de la Física, la Química, la Fisiología. Su libro arranca desde estas bases intuitivas y elementales porque posiblemente facilitan

la comprensión más que otras formalizaciones físicas o matemáticas y llegan finalmente al mismo destino.

Sus colegas en más de una ocasión nos referían como su esfuerzo clarificador lo lleva a escudriñar los rincones hasta que todo cuanto dice en clase o escribe, y lo hace con gran facilidad, lo domina sin sombras. Quienes han compartido con él pasillo, Juntas de Facultad, Academias, han celebrado juntos Tesis, publicaciones, entregas de premios, y han sabido del progreso de sus investigaciones porque comparte en cada instante su preocupación con el interlocutor.

Esta es otra destacable característica: entusiasmo contagioso, concentración absoluta en un tema. Es muy poderosa esta aptitud porque lo lleva indefectiblemente al frente del conocimiento, a la publicación relevante. Y más tarde lo repetirá en otro frente, demostrando de nuevo absoluto entusiasmo en el tema nuevo y reciente

Me han comentado como muchas veces y parece ser que Antonia su esposa lo confirma, Manuel Losada despierta y se sienta en la cama, pensando intensamente en la cuestión. Una vez, y otra, y otra, hasta que el tema, asediado, se rinde y el problema se resuelve. Entonces se queda tranquilo.

En la vida universitaria el Profesor Losada ha sido un referente. Nunca ha estado interesado por la política universitaria (enredos..., como los califica), aunque en más de una ocasión los temas le atraían y preocupaban. Por el contrario se ha centrado en la investigación y ha cuidado la docencia: textos de prácticas, material, laboratorios, organización del profesorado formado, etc. Se interesa siempre por el buen funcionamiento docente e investigador con un alto concepto de lo que es la Universidad.

En el edificio de la Facultad de Biología en el Campus de la Reina Mercedes, ha permanecido el departamento de Bioquímica desde 1976 hasta 1996, el período de mayor desenvolvimiento científico. En los 900 m² se superponían un Departamento Universitario y un Centro o Instituto del CSIC, en dificultades casi insuperables de espacio. Entre aparatos, estufas, cámaras, había pequeñas mesas de trabajo donde los investigadores apenas podían escribir.

Y nos seguía contando el Profesor García Novo: "El despacho de Losada, destartado, con esos muebles de aluvión tan frecuentes en

los centros universitarios, tenía algunas fotos en la pared de ilustres amigos bioquímicos: Ochoa, Arnon, un par de librerías, archivadores llenos de separatas y dos mesas, la de despacho, para cuestiones administrativas, y otra grande, negra, redonda, donde residía la inspiración. Estaba llena de libros que a veces se amontonaban en pilas o desbordaban por sillas y muebles. Y los he ido viendo cambiar de tema al pasar de los años. Siempre los libros estaban asociados a un mismo tema. Y el tema ha ido cambiando, a lo largo de esta fecunda vida universitaria. Capítulo a capítulo ha visto como el texto de Bioquímica ha ido saliendo de esta mesa creadora. Los primeros “monos”, dibujos preliminares, expresiones clarificadoras, capítulos enteros. Un día me llamó para pedirme una fotografía de la naturaleza donde estuvieran el sol, el agua y la tierra, con las plantas... era ya la portada de la obra”.

Ciertamente, en la nueva sede del Parque Tecnológico de la Cartuja a donde se han trasladado, las condiciones son mucho más favorables para el grupo. Pero desde luego, la pérdida para la Facultad de Biología, es cuantiosa e importante según nos afirman muchos de sus colegas.

Su preocupación por la ciencia ha movido y estimulado a muchos, y siempre, siempre, recordaremos su tema favorito, la luz del sol, nos subraya García Novo. O como el pronuncia, en su acento de Carmena: “la lus del Zol”.

Con el fin de dar el mayor realce posible a esta intervención, hemos establecido también contacto con la Dra. Antonia Herrero, Directora actual del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Centro Mixto del CSIC y la Universidad de Sevilla, que amablemente nos ha facilitado algunos comentarios sobre la relevancia del trabajo del grupo en el citado Instituto de Sevilla. De esta forma la Dra. Herrero subraya: “Desde mi punto de vista, la aportación científica más relevante del Dr. Manuel Losada ha sido el concepto de que la reducción del nitrato a amonio en vegetales, incluyendo las cianobacterias, algas y plantas, es un proceso genuinamente fotosintético que utiliza el poder reductor generado a expensas de la energía lumínica”. Ciertamente esta afirmación es un hecho importante y de mayor trascendencia.

Según la Dra. Herrero parece ser que ésta fue en su momento (mediados de los años 60) una propuesta realmente innovadora, puesto

que ampliaba el concepto de fotosíntesis, entonces prevaleciente, que la definía como la fotorreducción del anhídrido carbónico acoplada a la oxidación del agua. Mediante los trabajos realizados entonces, el grupo de investigación liderado por el Prof. M. Losada contribuyó significativamente a la noción de que la esencia de la fotosíntesis consiste en la transformación de la energía solar en energía química y poder reductor, en forma de determinados compuestos reducidos o con enlaces ricos en energía, que después se utilizan en una amplia variedad de procesos como la reducción del anhídrido carbónico o del nitrato, o el transporte de determinados compuestos al interior celular para la construcción de la célula y el mantenimiento de actividad vital.

Y continua la Dra. Herrero: "A modo ilustrativo del interés de esta aportación puede referir una anécdota en la que se ha visto implicado un grupo del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, entre los que me encontraba: visitamos el famoso Museo de Historia Natural de Londres, en el que, como es sabido, hay una magnífica sección dedicada a la Biología y, naturalmente, en ella se trata de la fotosíntesis, proceso que se definía entonces según la concepción convencional de fotorreducción del dióxido de carbono. Nosotros dejamos en un buzón de sugerencias una breve explicación de la nueva visión de fotosíntesis que habíamos aprendido del Dr. Losado. Cuál no sería nuestra sorpresa y satisfacción al volver a aquel museo en 1992 y encontrar que allí la fotosíntesis se definía ya según la nueva y ampliada visión que nosotros habíamos promocionado".

Así mismo nos informa la Dra. Herrero: "También muy importantes entre los trabajos del Prof. Manuel Losada han sido los estudios del mecanismo de la reducción asimilatoria del nitrato a amonio, principalmente en organismos fotosintéticos (cianobacterias, algas y plantas), pero también en bacterias heterótrofas. De hecho, nuestro Instituto, siguiendo los trabajos pioneros del Dr. Losada, ha hecho una contribución fundamental al conocimiento global de las rutas de asimilación del nitrato (sistemas de transporte, enzimas implicados, regulación), que hoy en día está siendo reconocida a nivel internacional. El interés del conocimiento de la asimilación biológica del nitrato se hace evidente si se considera que el nitrógeno es uno de los constituyentes más importantes, tanto cualitativa como cuantitativamente de la materia viva, y que el nitrato es la fuente de nitrógeno más

abundante en la naturaleza para su utilización por los productores primarios, que son los organismo capaces de transformar la materia inorgánica poniendo así ésta a disposición del resto de los seres vivos". Nos interesa subrayar que los trabajos pioneros de nuestro Académico de Honor en este campo quedaron recogidos en la famosa revisión del *Ann. Rev. Plant Physiol* del año 1981, que ha sido durante varios años el artículo más citado de los publicados en inglés por autores españoles.

En cuanto a las líneas de investigación en las que el Prof. Losada se ha centrado más durante los últimos años versan sobre sistemas bioquímicos de transducción de la energía y energetización del ortofosfato. Es evidente que se trata de aspectos biológicos cruciales. Mi impresión, subraya la Dra. Herrero, es que las premisas que se postulan están basadas en cuidadas elaboraciones teóricas, que son difíciles de contrastar experimentalmente. No obstante, si con el paso del tiempo se demostrara que éstas son válidas, supondrían una aportación extraordinaria al conocimiento de los seres vivos.

En estos párrafos hemos tratado pues de presentar al Profesor Manuel Losada como Académico de Honor de esta Real Academia. Confiamos en que su intervención, prevista a continuación, les convencerá a todos de la elección acertada del nuevo académico de esta institución.

Muchas gracias por su atención, he dicho.

JULIO R. VILLANUEVA

DISCURSO DE INGRESO

EXCMO. SR. D. MANUEL LOSADA VILLASANTE

Excmo. Sr. Presidente,

Excmas. Sras. y Srs. Académicos,

Señoras y Señores

Es para mí un altísimo honor y un privilegio muypreciado y entrañable haber sido nombrado miembro de la Real Academia de Farmacia, pues mi carrera científica e investigadora se inició precisamente en la Facultad de Farmacia de Madrid en 1947, junto a un grupo muy querido de compañeros y amigos —hoy felizmente representado muy dignamente en esta Academia—, de la mano de distinguidos profesores, concretamente de don José María ALBAREDA y de don Ángel SANTOS RUIZ, así como de don Salvador RIVAS, don César GONZÁLEZ, don José María PERELLÓ, don Luis RECALDE, don Lorenzo VILAS, don Ricardo MONTEQUI, don Cándido TORRES, don Román CASARES, don Ramón PORTILLO, don Felipe GRACIA, don Guillermo FOLCH y don Eugenio SELLÉS. De entonces arranca mi vocación por la profesión farmacéutica y por la Biología y la Bioquímica microbiana y vegetal, que ellos supieron despertar y promover. A la visión y entusiasmo de don José María debo de manera especial —tras un provechoso noviciado en el Instituto de Edafología y Biología Vegetal de Madrid y en el Centro de Aula Dei de Zaragoza, ambos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)— mi posterior formación en Centros de vanguardia de Europa y América durante el periodo 1954-1961.

Después de mi estancia como becario predoctoral en el Instituto Botánico de la Universidad de Münster —donde trabajé en la Citología de los orgánulos fotosintéticos y respiratorios de hojas y raíces bajo la dirección del profesor STRUGGER— y en el Laboratorio Carlsberg de Copenhague —donde realicé mi tesis doctoral sobre Genéti-

ca-bioquímica de levadura bajo la dirección del profesor WINGE—marché como postdoctor a la Universidad de California en Berkeley para investigar durante cuatro años con el profesor ARNON en la Fisiología Celular y Bioquímica de la Fotosíntesis en bacterias, algas y plantas superiores.

A mi llegada a Berkeley era un dogma científico que la energía de los fotones de la luz solar se utilizaba directamente para romper los enlaces de la molécula de dióxido de carbono (hipótesis de WARBURG) o, alternativamente, de la molécula de agua (hipótesis de Van NIEL y reacción de HILL, ARNON y OCHOA). Como repetidamente ha subrayado el profesor ARNON, al estudiante de hoy le resulta difícil darse cuenta de que el concepto de que el *flujo de fotones* induce el *transporte cíclico y no cíclico de electrones en los cloroplastos* no fue introducido hasta comienzos de los años 60, y a mí me cupo ciertamente la satisfacción de contribuir decisivamente a la formulación de este concepto fundamental en bioenergética y al establecimiento definitivo de que la reacción básica de la fotosíntesis oxigénica es la *fotolisis del agua catalizada por la clorofila con el concurso de los fotosistemas II y I*, que participan en serie. Ello nos permitió también establecer el mecanismo básico del transporte de electrones en la fotosíntesis anoxigénica, que tanto atrajo a STANIER.

A mi regreso a España y a instancias de don José María Albareda, se constituyó en 1964 el primer Instituto de Biología Celular de nuestro país en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid por agregación de las Secciones de Citología, Microbiología y Bioquímica, dirigidas por GIMÉNEZ MARTÍN, RODRÍGUEZ VILLANUEVA y LOSADA. Del CIB irradiaron felizmente en 1967 varios centros mixtos a las Universidades de Salamanca, Sevilla y Autónoma de Madrid, transmitiendo a los nuevos grupos recién nacidos el llamado por el inolvidable Carlos ASENSIO «espíritu de Velázquez», caracterizado por una loable ambición de lograr un alto nivel de excelencia tanto en la enseñanza como en la investigación. Este trasplante representó, en palabras de Alberto SOLS, «una sucesión de éxitos que aconseja fuertemente la multiplicación de casos mientras que la capacidad de crecimiento de los núcleos centrales del CSIC permita dar sin desangrarse, sembrando núcleos de excelencia por todo el país y en el seno de las universidades donde se forman las generaciones futuras».

En las décadas de los 60 y 70, primero en Madrid y después en Sevilla, nuestro grupo introdujo otro concepto fundamental en fotosíntesis, que vino a añadirse al de la foto-óxido-reducción del agua. En efecto, pudimos demostrar que la fotosíntesis no se limita a la *asimilación, a expensas de la energía luminosa, del dióxido de carbono* —proceso esclarecido por CALVIN— sino que incluye igualmente la *reducción del nitrato, o dinitrógeno, a amoníaco por el agua*, con desprendimiento concomitante de oxígeno molecular:

Es interesante subrayar que, aunque ya en 1920 WARBURG había demostrado que las células iluminadas del alga *Chlorella* —introducida por él mismo en el estudio de la fotosíntesis— reducen, en ausencia de CO₂ añadido, una variedad de aceptores de electrones, entre ellos nitrato, produciendo cantidades estequiométricas de oxígeno, este insigne fundador de la fotobioquímica no aceptó jamás que la reacción básica de la fotosíntesis fuera otra que la rotura por la luz del CO₂ activo, una reacción desconocida en química. Tozudamente, WARBURG defendió hasta su muerte, ocurrida en 1970, su original idea.

En su biografía sobre *Otto Warburg, cell physiologist, biochemist and excentric* (1981), su discípulo Hans KREBS —el bioquímico que más admiró OCHOA— dedicó varios capítulos a los principales logros científicos de su maestro, discutiendo en uno de ellos la importante cuestión del papel del carbono en la reacción primaria de la fotosíntesis: «Eventually, the clarification of the component reactions of photosynthesis revealed that the reduction of nitrate in light is linked to photosynthesis —without the participation of carbohydrate or carbon—». De las cuatro referencias que cita KREBS a este respecto, tres son de nuestro Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla.

El flujo de electrones a lo largo de la cadena de transporte respiratoria o de la cadena de transporte fotosintética se acopla con la síntesis de pirofosfato inorgánico (PP_i) o de adenosín trifosfato (ATP). OCHOA y ARNON acuñaron para uno y otro proceso el término de *fosforilación oxidativa y fotosintética*, respectivamente. Creo que pocos científicos han tenido, como yo, la suerte de vivir tan cerca de los padres de la fosforilación a nivel de membrana. Además, durante parte de la década de los 50 y hasta 1967 conviví en el CIB con SOLS,

pionero de la Enzimología en nuestra patria, que consagró gran parte de su vida al estudio de los enzimas implicados en la glicolisis, entre ellos, los que participan en la *fosforilación a nivel de sustrato*.

El descubrimiento del pirofosfato en bioquímica se debe a OCHOA. Su discípulo A. KORNBERG, que compartió con él el premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1959, se refirió a este relevante hallazgo en el libro *Reflections on biochemistry*, dedicado al maestro por sus colaboradores y amigos en su 70 aniversario, así como en su propia autobiografía *For the love of enzymes. The odyssey of a biochemist*: «Ochoa made a striking observation about six years earlier when he worked with the Coris. Liver particles metabolizing pyruvic and related acids produced inorganic (lacking carbon) pyrophosphate, a compound previously unknown as a cellular constituent. Inorganic pyrophosphate had been obtained by fusing two phosphate molecules through dehydration in an oven at 400 °C! The mechanism of the origin of inorganic pyrophosphate in the liver preparations was unknown. How funny that I should now be working on the origin of pyrophosphate».

Desde que MITCHELL propuso su *teoría quimiosmótica* es obvio que la síntesis de PP_i ó ATP es un proceso ácido-base promovido por un potencial electroquímico de protones, pero todavía constituye un reto de significación trascendental para los bioenergetistas la elucidación de los mecanismos de los procesos redox y ácido-base implicados en la fosforilación, tanto a nivel de sustrato como, especialmente, de membrana. Es nuestra conclusión que el *fuerte carácter básico del anión óxido* (O²⁻) y el *fuerte carácter oxidante del dióxígeno* (O₂) son las cualidades más significativas y genuinas de este primordial elemento en Bioenergética, y a ello dedicaré especialmente mi discurso de recepción.

Antes de analizar esta doble función del oxígeno, permítaseme, sin embargo, un inciso para recordar algunas de las consideraciones que hizo el profesor OCHOA en el VI Congreso Nacional de Bioquímica, celebrado en Sevilla a comienzos de la primavera de 1975. El Congreso tuvo lugar bajo la presidencia del profesor Federico MAYOR, y en él participaron los premios Nobel Carl CORI, Max DELBRÜCK, Hans KREBS, Luis LELOIR, Severo OCHOA y, el que lo sería más tarde, E.H. FISCHER.

De la intervención de don Severo en el acto de clausura para glorificar la figura de Alberto SOLS en la bioquímica española quisiera ahora destacar algunos párrafos que dejan constancia del papel desempeñado por las Facultades de Farmacia en la enseñanza de la Bioquímica en España y destacan asimismo la labor de insignes miembros de esta Real Academia de Farmacia en pro de la docencia y de la investigación en la Universidad y en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas: «Creo que los biólogos españoles de mi generación y de la de SOLS derivamos directamente de CAJAL y debemos nuestra trayectoria vital al impacto de su colosal labor y al estímulo y ejemplo de su extraordinaria personalidad. La etapa cajaliana se inicia en la segunda mitad del siglo pasado y termina con la muerte de don Santiago poco antes de la guerra civil... Para mí, CAJAL fue lucero y guía de todos los biólogos de estirpe hispana de la generación posterior, así como lo fue de muchos de su propia generación».

«En 1936 se inicia un periodo de eclipse de la ciencia española, que comienza con la guerra civil y dura varios años. Aquí es donde quiero colocar la figura de Alberto SOLS, quien contribuyó de manera destacada al renacimiento de la ciencia española haciendo surgir con vigor inusitado una ciencia, la bioquímica, que apenas había iniciado su aparición en el ámbito científico español cuando comenzó el eclipse. Alberto SOLS, como muy bien dijo Manolo LOSADA, es pionero y quijote de la bioquímica española... El quijotismo de SOLS iba a tropezar con enormes dificultades, pero era realizable para un hombre de su capacidad y su tesón. En ello debemos reconocer la base que encontró en la labor de dos hombres que le precedieron. Estos fueron José Luis RODRÍGUEZ CANDELA, científico pionero y entusiasta gestor del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que tendió una mano a SOLS y le atrajo a dicho Centro, y Ángel SANTOS RUIZ, que inició en solitario la enseñanza y la difusión de la bioquímica en España a partir de la guerra civil».

«No se puede hablar de SOLS sin insistir en la importancia que para la ciencia española tuvo y tiene el Consejo Superior de Investigaciones Científicas... Sin el Consejo, no creo que hubiera podido realizarse en España la labor científica que se llevó a cabo desde que el país, finalizada la guerra civil, pudo rehacer su economía y su vida y

salir de la fase de eclipse mencionada anteriormente... Quiero dedicar aquí un sentido recuerdo a la figura del padre José María ALBAREDA, que durante muchos años, mas aún que su secretario general, fue el alma y la inspiración del Consejo. Sin ALBAREDA, el Consejo tal vez no hubiera existido y sin él no hubiera llegado la biología, y dentro de la biología la bioquímica española, a alcanzar el grado de desarrollo que tiene en la actualidad. Igualmente quiero recordar el valioso y decidido apoyo prestado al Consejo por Manuel LORA TAMAYO. El nombre del Consejo está vinculado sin duda a muchas personas, pero está ciertamente indisolublemente unido a estos dos hombres»

Tipos de aire: “espíritu del nitró” y “flogisto”

En sus comienzos, la Química, la Física y la Biología se desarrollaron como ciencias muy ligadas a la caracterización y medida de los gases, y fue precisamente la demostración de que había distintos «tipos de aire» y el establecimiento de sus comportamientos y propiedades y de la estequiometría de las reacciones entre ellos lo que permitió formular sus leyes fundamentales y aclarar ciertos procesos químicos y biológicos básicos, como la *calcinación* y *combustión*, por un lado, y la *fermentación*, *respiración* y *fotosíntesis*, por otro, sentando así las bases de la Química y de la Fisiología. Hasta entonces se consideraba que el aire era simplemente un medio inerte que, aunque usualmente presente, sólo actuaba como agente físico. El ínclito PARACELSO creyó que el aire contenía un «espíritu vital» esencial para la vida, que después se llamó «espíritu del nitró» y «aire desflogisticado» y hoy llamamos oxígeno. Con este elemento como base construyó LAVOISIER la Química moderna.

Pero fue el gas actualmente conocido como dióxido de carbono —el primer «gas» identificado de hecho como distinto del «aire común»— el que ciertamente dio origen al estudio de los distintos tipos de aire. Irónicamente, su descubridor, el iatroquímico flamenco Van HELMONT —curiosa mezcla de alquimismo y espíritu científico, contemporáneo de BACON, GALILEO, HARVEY y DESCARTES e introductor con PARACELSO de la palabra *gas* (del griego «chaos»)— no se percató de que el dióxido de carbono es la fuente de todo el car-

bono de la biomasa. Y ello a pesar de haberlo caracterizado él mismo como producto de la combustión de la materia vegetal, de la eructación y de la fermentación del mosto, llamándolo «gas de madera» y «gas silvestre», y de haber realizado con clarividencia y rigurosidad ejemplar un experimento clásico para ver de qué se alimentan y, en consecuencia, de qué se componen las plantas.

Van HELMONT identificó también este tipo de «aire» como producto de la acción de los ácidos sobre la caliza y lo encontró en la «Grotto del Cane», Italia, donde los perros se asfixian por no poder respirar el «aire» que se escapa por las grietas del suelo y que por ser más pesado que el «aire común» se acumula en las partes más bajas. Entre los gases mencionados por Van HELMONT se encuentran, además, los que se generan en el intestino en la putrefacción (hidrógeno, metano) y los que se producen en ciertas reacciones químicas (óxido nítrico, dióxido de azufre, etc.). Con razón se le considera el fundador de la «Química pneumática».

Desde tiempos de los alquimistas medievales se sabía que los metales —excepto el oro y la plata— se convierten en escorias, o *cales* (del latín «calx»), al ser «calcinados» en crisoles abiertos al aire, pero, a partir del siglo XVII, los químicos prestaron gran atención al hecho de que las cales que resultan del calentamiento de los metales son más pesadas que éstos. Parece ser que el primero en interpretar correctamente el aumento de peso de los metales al ser calcinados fue un humilde médico-farmacéutico francés, REY, contemporáneo también de Van HELMONT. En 1630, REY concluyó con triunfal orgullo que la causa que determina el aumento de peso del plomo y del estaño durante la calcinación proviene de que el aire se combina con el metal en la cal. REY también calentó antimonio con luz solar mediante una lente, excluyendo así que el aumento de peso pudiera deberse al fuego de la leña o del carbón.

El físico e ingeniero alemán Von GUERICKE se adelantó a químicos y biólogos al demostrar que ni las velas pueden arder ni los animales respirar en el *vacío*, que había conseguido producir con su famosa bomba, inventada en 1650. GUERICKE publicó en 1672 los resultados de sus famosos experimentos en su *Experimenta nova magdeburgica de vacuo spatio*. El célebre químico y físico británico BOYLE construyó en 1658, con la colaboración de su brillante ayudante HOO-

KE, una bomba de vacío, que perfeccionó a la de GUERICKE, y corroboró que ni la respiración ni la combustión pueden tener lugar en ausencia de aire, así como que estos procesos sólo consumen parte del mismo. Mucho antes que ellos, el gran artista e ingeniero florentino Leonardo Da VINCI había hecho notar, como gran profeta de la ciencia, que «donde no arde la llama no hay animal que aliente».

BOYLE creyó, como su héroe Francis BACON, defensor y propagador del «método científico», en la ciencia en sí y por el poder que su aplicación debería conferir al hombre sobre la naturaleza. BOYLE fue miembro del «Invisible College», una tertulia informal de científicos que constituyó el núcleo inicial de lo que sería más tarde la «Royal Society». Integrando el grupo que se llamó de los «químicos de Oxford» aparece, junto a BOYLE y HOOKE, MAYOW, también discípulo de BOYLE. MAYOW se doctoró en leyes, pero se pasó a la medicina, escribiendo en 1674 su *Tractatus quinque medico-physici*, una obra clásica. Por la significación y repercusión que tuvieron un siglo más tarde en el desarrollo de la Química y la Biología los experimentos que realizaron estos tres destacados pioneros en los campos de la calcinación, la combustión y la respiración, y por las conclusiones que ellos mismos sacaron de sus experimentos sobre el «espíritu vital, o nitro-aéreo», es importante tratar estos temas con algún detalle.

En 1675, BOYLE observó que el precipitado rojo que se forma al calcinar mercurio al aire se «reduce» de nuevo a metal líquido al calentarlo más fuertemente. Este experimento conduciría un siglo más tarde al descubrimiento del oxígeno por SCHEELE, PRIESTLEY y LAVOISIER, pero BOYLE había concluido erróneamente que el aumento de peso observado en la calcinación del estaño se debía a la fijación por el metal de las partículas de fuego que, a pesar de su carácter material, pasaban durante el calentamiento a través de las paredes del recipiente de vidrio utilizado para la calcinación.

Sin embargo, en sus experimentos con los no metales, carbono, azufre y el recién descubierto fósforo, BOYLE había hecho notar en 1673 que ardían en el aire, llamando también la atención sobre el interesante hecho de que, en ausencia de aire, las sustancias podían arder igualmente cuando se las mezclaba con nitro, o salitre, como era el caso del azufre y el carbono en la pólvora. Un aspecto importante sugerido vagamente o subrayado explícitamente por los tres químicos británicos

fue que «la misma sustancia contenida en el nitro existe en aire y permite la combustión y la respiración», procesos que ocurren con gran liberación de calor. BOYLE habló del «nitro volátil»; HOOKE, del «aire nitroso», y MAYOW, de «partículas ígneo-aéreas», «partículas nitro-aéreas», o «espíritu nitro-aéreo» (*spiritus nitro-aereus*).

Los primeros intentos para explicar el mecanismo de la respiración animal fueron realizados por el médico inglés LOWER, miembro, como BOYLE, del «Invisible College», que publicó en 1669 su *Tractatus de corde*. LOWER observó que la sangre oscura que llega a los pulmones por la arteria pulmonar entra en contacto con el aire absorbido por los capilares en los alveolos y sale con un hermoso color rojo por la vena pulmonar. LOWER fue, de hecho, el primero en asignar a la respiración la función de añadir a la sangre una sustancia o espíritu, que mencionó de pasada como «espíritu nitroso», o «alimento nitroso».

ARISTÓTELES pensaba que la vida dependía del «calor innato», el cual llegaría a quemar el cuerpo animal si el aire no mitigara sus efectos. El sabio griego creyó pues que la respiración servía para enfriar el cuerpo animal y que esta función era innecesaria para los peces, que se refrescaban a sí mismos haciendo meramente circular agua a través de sus agallas. Estos mismos razonamientos fueron defendidos por GALENO. De hecho, hasta los trabajos experimentales de LOWER y MAYOW no se explicó científicamente la esencia de la respiración como un proceso fisiológico destinado a la producción de calor animal, una idea ya adelantada por Van HELMONT, si bien el médico belga atribuyó el origen del calor durante la respiración a la fricción producida por los latidos del corazón.

MAYOW demostró experimentalmente el claro paralelismo existente entre combustión y respiración: una vela encendida en el interior de una campana invertida sobre agua ardía durante cierto tiempo, consumiendo parte del aire, a la par que el nivel del agua ascendía en el contenedor. Un fenómeno parecido ocurría cuando se introducía un ratón en la campana, pero el pequeño animal se asfixiaba bastante antes de que se apagara la vela. La conclusión de MAYOW fue que el aire contenía dos componentes o espíritus: uno, el nitro-aéreo, que se consumía en la combustión o respiración, y otro que quedaba inusado después del proceso. Según MAYOW, el calor

animal se debía a la interacción en los músculos de las partículas combustibles contenidas en la sangre con el espíritu nitro-aéreo del aire inspirado.

MAYOW dio también cuenta clara del desplazamiento del ácido nítrico, más volátil, de sus sales por el ácido sulfúrico: «No doubt it is because the volatile acid salt of the nitre has been expelled from the society of the alkaline salt by the more fixed vitriolic acid that the acid of nitre, now liberated from union with the alkaline salt, ascends under a heat no greater than is required for the rectification of the spirit of nitre». El *nitro* se componía pues de dos porciones: una *parte térrea*, o «sal fixum» (potasa), y otra *parte ácida volátil* (ácido nítrico) que contenía el «espíritu nitro-aéreo». Estas conclusiones tendrían consecuencias decisivas de largo alcance en el despertar de la Química al ser interpretadas equivocadamente por LAVOISIER en su formulación del *concepto de ácidos*.

Como antes lo hiciera REY, MAYOW hizo también un experimento importante sobre calcinación: calentó antimonio con una lente y observó que la cal aumentaba de peso, pero, en lugar de atribuir el fenómeno a la fijación de la luz —siguiendo un razonamiento similar al de BOYLE—, lo explicó correctamente como debido a la fijación del espíritu nitro-aéreo de la atmósfera por el metal, coincidiendo así con REY. MAYOW murió muy joven, a los 39 años, pero se adelantó en un siglo a PRIESTLEY, SCHEELE y LAVOISIER en el descubrimiento de *la función del espíritu nitro-aéreo* en los procesos de la calcinación, combustión y respiración. Su afirmación de que «*inter principia rerum naturalium principem locum obtinet spiritus nitro-aereus*», es decir, de que el gas llamado más tarde «oxígeno» ocupa un lugar preeminente en la química y en la naturaleza, fue una clara enunciación de lo que el gran LAVOISIER ratificaría en los albores de la Química moderna.

Habiendo sido Van HELMONT el primero en advertir que hay distintas clases de aire, y en identificar el actual dióxido de carbono como producto de la combustión y de la fermentación, resulta difícil explicar que no cayera en la cuenta de que el gas que libera la madera al arder o el mosto al fermentar es el mismo que fijan las plantas al crecer, sobre todo después de haber realizado lo que se considera el primer experimento en las Ciencias Biológicas sobre la nutrición vege-

tal y concluir que las plantas se alimentan, y en consecuencia se componen, exclusivamente de agua.

Hacia comienzos del siglo XVIII, el clérigo y naturalista inglés HALES fue el primero en recoger los gases en recipientes *ad hoc* sobre agua y en reconocer que «una fracción del aire» contribuye a la nutrición de las plantas, haciéndolo así constar en su famoso libro *Vegetable staticks*, publicado en 1727, el año de la muerte de su influente y admirado maestro NEWTON: «It is well known that air is a pure elastic fluid, with particles of very different kinds, whereby it is admirably fitted by the great Author to be the breath of life, of vegetables as well as animals... We may therefore reasonable conclude that one great use of leaves is what has been suspected by many, viz., to perform in some measure the same office for the support of the vegetable life that the lungs of animal do for the support of animal life; plants very probably drawing thro' their leaves some part of their nourishment from the air». HALES figura, junto con Van HELMONT, como fundador de la Fisiología vegetal. Ambos científicos se apartaron de la tesis de ARISTÓTELES de que las plantas se alimentan del *humus* del suelo, pero los tres acabarían teniendo finalmente razón: «agua», «aire» y «tierra» son los tres «elementos materiales» fundamentales de la nutrición vegetal.

El médico y químico escocés, nacido en Francia, BLACK redescubrió definitivamente e identificó mejor la conducta química del «gas de madera», o «gas silvestre», de Van HELMONT mediante medidas ponderales realizadas en 1754-56. BLACK encontró que, al calentar la «magnesia alba» (carbonato básico de magnesio) se desprendía de manera reversible un gas, al que llamó «aire fijado», idéntico al gas silvestre de Van HELMONT, y observó también que la «magnesia calcinada» (óxido de magnesio) es más ligera y más alcalina que la magnesia alba. BLACK descubrió asimismo que la magnesia calcinada no libera ningún «aire» ni produce efervescencia con los ácidos y corroboró el hallazgo de HALES de que las sales alcalinas contienen gran cantidad de aire fijado, el cual emiten en abundancia cuando se las trata con ácidos. BLACK distinguió, pues, claramente, el carácter ácido del aire fijado. Este aire fue identificado también por BLACK como producto de la combustión, de la fermentación y de la respiración de los animales, y reconocido como uno de los componentes del aire atmosférico. BLACK confirmó las

observaciones de Van HELMONT de que el aire fijado no permite la combustión ni la respiración.

En 1774, el químico sueco BERGMAN llamó «aire ácido» al aire fijado de BLACK, y PRIESTLEY hizo constar esta observación en 1772 en uno de sus escritos: «It is not improbable but that fixed air may be of the nature of an acid, though of a weak and peculiar sort. Mr. Bergman, who honoured me with a letter upon the subject says that it changes the blue juice of tournsole into red». El propio PRIESTLEY inició en 1767 su carrera científica en Leeds, donde había sido destinado como párroco, investigando las propiedades del aire fijado que se producía por fermentación en una fábrica de cerveza cercana. PRIESTLEY advirtió que el aire fijado se disolvía en agua en una cierta proporción dando lugar a una bebida refrescante y agradable, el «agua acídula o agria», que hoy se llama también agua carbónica, de Seltz, o soda.

PRIESTLEY —el pastor presbiteriano no conformista y simpatizante de la Revolución francesa, que hubo de huir de Birmingham a América en 1794 ante el furor de las turbas que quemaron su casa, libros y escritos de su biblioteca y destruyeron sus instrumentos de laboratorio— es, por tanto, el padre de la gigantesca industria de bebidas gaseosas refrescantes. PRIESTLEY aumentó además enormemente el conocimiento sobre los gases al recoger sobre mercurio varios de ellos que eran solubles en agua (amoníaco, óxido nitroso, dióxido de azufre, cloruro de hidrógeno).

Después de la clarividente interpretación de los fenómenos de la combustión, calcinación y respiración por REY y MAYOW, la tenebrosidad apareció de nuevo en los trabajos de los químico-médicos de Corte alemanes BECHER y STAHL, que invirtieron los términos y conceptos empleados anteriormente para explicar dichos fenómenos.

La teoría del *flogisto*, completamente opuesta, se extendería por Europa a partir de 1700, adquiriendo una solidez difícil de derogar. El «flogisto» (del griego, «combustible o inflamable») era un «principio inflamable», algo misterioso que «se desprendía» de los cuerpos al arder (el principio de la combustibilidad y levedad) y que «perdían» también los metales al oxidarse y «perder» también, en consecuencia, su calidad. La función del aire, cuya presencia es necesaria para la combustión y la calcinación, se reduciría a la de llevarse el flogisto, in-

dispensable para estos procesos. La teoría del flogisto originó tal confusión y enredó tanto las cosas entre los propios químicos que era difícil salir del atolladero. Químicos de la categoría de CAVENDISH y PRIESTLEY (descubridores en 1766 del hidrógeno y en 1771-74 del oxígeno, respectivamente) fueron tan fieles seguidores de la teoría del flogisto que bautizaron a los elementos por ellos descubiertos como «aire inflamable» (flogisto) y «aire desflogisticado» (ávido de flogisto). El descubridor del nitrógeno en 1772, Daniel RUTHERFORD, dio a su aire —inerte más que mefítico— el nombre de «aire flogisticado» (saturado de flogisto).

BECHER, profesor de Medicina en Maguncia (Alemania) y fecundo escritor, tuvo la desafortunada ocurrencia de dar, en un libro titulado *Physica subterranea* (1669), nuevos nombres a los ya de por sí ambiguos *tria prima* (sal, azufre y mercurio) de PARACELSO, introduciendo los de «tierras»: *terra fusilis* (fusible), *vitreous* (vítrea) o *lapidia* (sólida); *terra pinguis* (combustible) o *inflammable* (inflamable); y *terra fluida* o *mercurialis* (fluida o volátil). En la combustión y la calcinación, la *terra pinguis*, que ocasionalmente cita como flogisto, es expulsada, quedando como residuo la ceniza o la cal. Para BECHER, el plan del Creador se centraba principalmente en la vida orgánica, y los metales eran sólo productos secundarios. La *terra pinguis*, o «tierra oleosa», se encontraba fundamentalmente en la materia vegetal o animal.

La teoría de BECHER no añadía nada nuevo ni hubiera ejercido de por sí más influencia, pero su discípulo STAHL la integró en una teoría central de la Química que, como tal, dominó esta ciencia hasta casi finales del siglo XVIII. En contraste con su maestro, STAHL centró su atención en los compuestos inorgánicos y enfatizó el nombre de flogisto en lugar del de tierra oleosa. De acuerdo con STAHL, cuando se calcinaba un metal, el flogisto se perdía y se lo llevaba el aire, que se «flogisticaba», y el metal se convertía en cal. El metal era, pues, una sustancia más compleja que la cal. Las sustancias orgánicas vegetales y animales eran ricas en flogisto y ardían con facilidad, escapándose el flogisto con la llama. El carbón era extremadamente rico en flogisto: cuando se calentaba la cal de un metal mezclada con carbón, éste cedía su flogisto a la cal, y ésta se convertía en metal. El flogisto no se podía obtener aislado, sino que se transfería de una sustancia a otra, por lo que había que considerarlo como un «principio», no como una sustancia con entidad física.

El hecho de que las sustancias orgánicas perdieran peso al arder, expulsando en consecuencia el flogisto y convirtiéndose en ceniza, en tanto que los metales ganaran peso en un proceso análogo, no pareció importarle gran cosa a STAHL. Para explicar el aumento de peso de los metales durante la calcinación, algunos químicos atribuyeron al flogisto una cualidad hipotética: la liviandad o peso negativo. Estas ideas y la creencia de que los metales también perdían flogisto al ser tratados con ácidos hicieron que CAVENDISH creyera que había descubierto el flogisto en vez del hidrógeno, y que RUTHERFORD y PRIESTLEY pensaran que habían descubierto el aire flogisticado y desflogisticado, respectivamente, en lugar del nitrógeno y oxígeno. El derrumbe total de la teoría del flogisto —que de hecho nació, desafortunadamente, después de haberse demostrado su falsedad— se debió fundamentalmente, a los trabajos realizados por LAVOISIER entre 1770 y 1790.

Con rabia y orgullo, pero sin dar humildemente las gracias ni reconocer las contribuciones y méritos de sus antecesores y contemporáneos respecto a la «teoría de la combustión», así como de «la teoría de los ácidos y las bases», LAVOISIER escribió en 1792, refiriéndose a sus propios colaboradores: «Esta teoría no comenzó a ser enseñada por FOURCROY sino en el invierno de 1786 a 1787; no fue adoptada sino en época posterior por GUYTON-MORVEAU; en fin, en 1785, BERTHOLLET escribía aún en el sistema del flogisto. Esta teoría no es pues, como muchas veces se proclama, la teoría de los químicos franceses; es la mía, y es una propiedad que reclamo ante mis contemporáneos y ante la posteridad. Otros, sin duda alguna, habrán añadido cosas nuevas que la hayan perfeccionado, pero no se me podrá negar, lo espero, toda la teoría de la oxidación y de la combustión; el análisis y la descomposición del aire por los metales y los cuerpos combustibles; la teoría de la acidificación;...la teoría de la respiración, en la cual SEGUIN ha colaborado conmigo».

Se cuenta que en 1785, al darse cuenta LAVOISIER y sus colegas de que habían alcanzado la victoria sobre la teoría del flogisto, celebraron una reunión solemne en París, en la que Mme. LAVOISIER, en traje de sacerdotisa, quemó sobre un altar los *Chemiae dogmaticae et experimentalis fundamenta* de STAHL, mientras una orquesta tocaba una marcha fúnebre. En Alemania se consideró esta prosopopeya como una provocación y una ofensa nacional. LAVOISIER fue insul-

tado como un «herético de la ciencia», y un retrato suyo fue quemado con idéntica solemnidad. LAVOISIER sería guillotinado el 8 de mayo de 1794, háce unos dos siglos. El matemático, físico y astrónomo francés LAGRANGE, introductor del Sistema Métrico Decimal, comentó compungido y avergonzado: «Ha bastado un instante para hacer caer esta cabeza, pero quizás no basten cien años para que surja otra semejante».

Los seis bioelementos primordiales (H, C, N, O, P, S)

Aunque se considera que la «Revolución química» es coetánea de la «Revolución francesa» y que el fundador de la *Química moderna* fue el genial químico francés LAVOISIER, no es menos cierto que su precursor fue el fisicoquímico irlandés BOYLE. El libro de BOYLE *The sceptical chymist* (1661) —como más tarde el de LAVOISIER *Traité élémentaire de chimie* (1789)— es clásico en la historia de la Química.

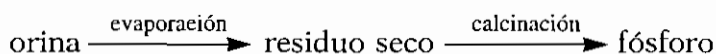
BOYLE es considerado como uno de los precursores de la Química moderna, especialmente por tres razones: 1) Se dio cuenta de que la química merece ser estudiada por sí misma, y no meramente como una ciencia auxiliar de la medicina o de la alquimia, a pesar de que creía en la transmutación. 2) Introdujo un método experimental riguroso en química. 3) Definió claramente que los «cuatro» elementos de los griegos y los tres «principios» de los alquimistas no debían ser llamados elementos ni principios, ya que ninguno de ellos podía ser extraído de los cuerpos. Además de buen experimentador, BOYLE mejoró gran cantidad de los aparatos existentes en su época e introdujo otros nuevos.

En contraste con los alquimistas, que sólo admitían los siete *metales* antiguos (oro, plata, cobre, estaño, hierro, plomo y mercurio), los químicos metalúrgicos aceptaron otros nuevos, de los que hicieron mención en sus escritos. Cuando, a fines del siglo XVIII, LAVOISIER presentó en su obra clásica su lista de los elementos químicos, incluyó en el grupo de las sustancias simples metálicas —además de los siete metales tradicionales y del antimonio, arsénico, cinc y bismuto— los seis metales descubiertos en la segunda mitad de su siglo (cobalto, platino, níquel, manganeso, molibdeno y wolframio): en total, diecisiete.

En la lista de los elementos químicos de LAVOISIER y en el grupo de las «sustancias simples no metálicas» figuraban dos *elementos no metálicos* conocidos desde tiempos remotos, *carbón*, de símbolo C, y *azufre*, de símbolo S, así como un nuevo no metal descubierto en el siglo anterior, el fósforo. También figuraban en otro grupo algo misceláneo, pues incluía nada menos que a la «luz» y el «calórico», los tres elementos gaseosos descubiertos en su época, de honda repercusión en la historia de la Química y de la Bioquímica, que él mismo y sus colegas bautizarían con los nombres aparentemente *ad hoc* que hoy nos resultan tan extraordinariamente familiares: hidrógeno, nitrógeno y oxígeno.

Estos seis elementos no metálicos constituyen el grupo de los elementos primordiales de la materia viva, pues en ellos y en los simples compuestos inorgánicos que forman entre sí tiene su origen, a través de la fotosíntesis, toda la biomasa, y a ellos torna la materia orgánica tras su respiración y mineralización, cerrando el ciclo de la materia en la biosfera.

El primer elemento nuevo —no conocido en forma alguna antes de su época, y cuyo descubrimiento puede atribuirse a un investigador concreto en una fecha precisa— fue el *fósforo* (del griego «fosforos», portador de luz, a través del latín «fosforus»), un no metal sólido, de símbolo P, del que existen varias formas alotrópicas. El expresivo nombre de fósforo (el mismo con que designó PITÁGORAS al «lucero de la aurora»— alude precisamente a una de sus propiedades más llamativas. Su descubridor fue el químico alemán BRAND, al que a veces se conoce como el último de los alquimistas, pues, buscando la piedra filosofal y pensando hallarla en la «orina», cuyo color parecía así sugerirlo, aisló por evaporación y calcinación de ésta (probablemente en 1669) una sustancia de aspecto céreo que relucía en la oscuridad. Hoy sabemos que, al calentar el residuo seco de la orina, los fosfatos se reducen a fósforo por la acción de los compuestos orgánicos simultáneamente presentes en ella:



Siguiendo la tradición de los alquimistas, BRAND mantuvo en secreto su método, pero otro laborioso y hábil químico alemán, KUNCKEL, consiguió, a través de un amigo a quien BRAND facilitó infor-

mación sobre su método, preparar en 1676 fósforo por destilación de orina concentrada con arena. Eventualmente, aunque el método no fue tampoco publicado, BOYLE tuvo conocimiento del interesante hallazgo, y él mismo pudo entonces aislar el bioelemento y publicar sus resultados en *Aerial noctiluca* en 1680.

Este alucinante elemento sería, después de los trece conocidos por los antiguos, el primero en la nueva serie de los elementos químicos, y su mágica luminiscencia entrañaba también un significado biológico todavía más trascendente: si alguno de los elementos lleva en sí la «chispa de la vida», éste podría ser el fósforo, aislado inicialmente por cierto de un líquido de procedencia orgánica. Tanto la moneda energética universal de los seres vivos (el sencillo pirofosfato, en las formas más primitivas, y el maravilloso ATP, en las más evolucionadas, ambos conteniendo el grupo metafosfato, $\sim\text{PO}_3$), como muchos coenzimas y metabolitos, los lípidos de las membranas y las macromoléculas portadoras de los caracteres hereditarios (ácidos nucleicos) son compuestos de fósforo.

Uno de los pioneros en el estudio de los gases y el primero que descubrió un elemento químico gaseoso, el llamado después hidrógeno, de símbolo H, así como que el agua no es un elemento químico, sino un compuesto de hidrógeno y oxígeno, fue el excéntrico y misógino físico-químico inglés CAVENDISH, uno de los grandes científicos de la historia, conocido como «el más rico de los filósofos y el más filósofo de los ricos». La mayor parte de sus trabajos científicos no fueron publicados hasta después de su muerte, ocasionando con ello no pocas controversias respecto a prioridades. En 1766 descubrió el «aire inflamable», o «flogisto», obtenido por acción de los ácidos sobre los metales cinc, hierro y estaño. Aunque el hidrógeno había sido, de hecho, obtenido por este procedimiento un siglo antes (1670) por BOYLE, se considera a CAVENDISH, que determinó sus notables propiedades físicas y químicas, como su verdadero descubridor.

Veinte años después del descubrimiento del aire inflamable por CAVENDISH, LAVOISIER y sus colaboradores GUYTON De MORVEAU, BERTHOLLET y FOURCROY, seguramente impresionados por el hecho de que su reacción de combustión en oxígeno resultara en la formación de agua, bautizaron en 1787 al nuevo elemento con el nombre de *hidrógeno* (del griego, «generador de agua»). Ninguno de ellos podía imaginar que había sido descubierto el elemen-

to químico más abundante en el Universo, ni que, con el tiempo, este elemento vital —que funciona en parte como átomo y en parte como partícula— habría de ocupar el puesto número uno en la Tabla Periódica.

El principal componente, cuantitativamente hablando, del aire atmosférico, el elemento químico después llamado nitrógeno, fue descubierto en 1772 por el discípulo de BLACK, Daniel RUTHERFORD, tío del novelista Walter SCOTT. RUTHERFORD encerró un ratón en una atmósfera limitada de aire hasta que murió por asfixia, y puso después a arder en el mismo recinto una vela y un trozo de fósforo hasta que una y otro se apagaron. A continuación eliminó el «aire fijado» (dióxido de carbono) que se había formado en el aire haciendo pasar a éste a través de un álcali fuerte. Al aire final que quedó —inerte, más que mefítico o nocivo— lo denominó «aire flogisticado», por creer que había acaparado todo el «flogisto» capaz de captar. LAVOISIER, descubridor de su verdadera naturaleza elemental, lo llamaría más tarde mofeta y *ázoe* (del griego «azoe», incapaz de sostener la vida), siendo el químico francés CHAPTAL quien, en 1790, lo rebautizó con su nombre actual de *nitrógeno*, o «formador de nitro», de símbolo N.

El segundo componente mayoritario del aire atmosférico, el gas que hoy llamamos oxígeno, de símbolo O, fue también descubierto por medio de un proceso biológico, en este caso la fotosíntesis, proceso inverso a la respiración. En efecto, que la vegetación purifica el aire viciado por la respiración de los animales o por la combustión fue un fenómeno encontrado de manera casual en 1771 por PRIESTLEY. Con gran sencillez, PRIESTLEY relató los resultados de sus ensayos en el primer volumen de su obra *Experiments and observations on different kinds of air* (1774): «I have been so happy as by accident to hit upon a method of restoring air which has been injured by the burning of candles and to have discovered at least one of the restoratives which Nature employs for this purpose. It is vegetation... Finding that candles would burn very well in air in which plants had grown a long time... I thought it was possible that plants might also restore the air which had been injured by the burning of candles. Accordingly, on the 17th of August, 1771, I put a sprig of mint into a quantity of air in which a wax candle had burned out and found that on the 27th of the same month another candle burnt perfectly well in it».

Los experimentos de PRIESTLEY fueron los primeros que de una manera racional explicaron por qué el aire de nuestro planeta permanece puro a pesar de que continuamente el hombre, los animales y la combustión tienden a hacerlo nocivo e irrespirable. El impacto del descubrimiento de la fotosíntesis no fue pues, en principio, en la Química o la Biología, sino en lo que hoy llamaríamos Ciencias Ambientales o Salud Pública. Este hecho quedó recogido en el discurso pronunciado por el médico británico PRINGLE, fundador de la moderna Medicina militar y presidente de la «Royal Society», con motivo de serle concedida a PRIESTLEY la Medalla Copley en 1773: «From these discoveries we are assured that no vegetable grows in vain, but that, from the oak of the forest to the grass in the field, every individual plant is serviceable to mankind; if not always distinguished by some private virtue, yet making a part of the whole which cleanses and purifies our atmosphere». PRIESTLEY observó también que los ratones se vuelven muy juguetones al respirar el «nuevo gas», y él mismo se sentía más ágil y ligero, llegando a imaginar que respirar su «aire desflogisticado» se convertiría algún día en un vicio menor entre los potentados.

El oxígeno fue aparentemente descubierto por vía química por el químico-farmacéutico SCHEELE entre los años 1770 y 1773 al hacer uso de una variedad de experimentos. SCHEELE destiló en una retorta nitro con «aceite de vitriolo» (ácido sulfúrico) y, después de absorber en lechada de cal los humos rojos de dióxido de nitrógeno que se formaban, recogió, en una vejiga atada al extremo del cuello del matraz, un gas incoloro, en el que una vela ardía con llama muy brillante. Llamó a este gas, —que preparó también calentando «salitre mercurial» (nitrato de mercurio) o, alternativamente, óxido de mercurio u óxido de manganeso— «aire de fuego», o «aire empíreo». SCHEELE entregó al impresor su libro *Tratado sobre el aire y sobre el fuego* en 1773, pero por negligencia de éste no apareció publicado hasta 1777.

SCHEELE se adelantó ciertamente en el descubrimiento del oxígeno por vía química a PRIESTLEY, que lo obtuvo el primero de agosto de 1774 por calentamiento del «mercurius calcinatus per se» mediante una lente muy potente. En una carta dirigida a Sir PRINGLE el 15 de marzo de 1775, PRIESTLEY, que, como SCHEELE, era fiel seguidor de la teoría del flogisto, llamó al gas por él descubierto «aire

desflogisticado». En 1874, con motivo del primer centenario de la publicación del libro de PRIESTLEY sobre diversas clases de aire, 77 químicos se reunieron en su antigua casa de Northumberland (Pensilvania, EEUU) para celebrar el descubrimiento del oxígeno, siendo este acontecimiento el que dio lugar a la creación de la «American Chemical Society» en 1876.

SCHEELE, quizás el boticario más famoso y de peor suerte del mundo, reconoció también que el aire común era una mezcla de «aire de fuego» y de «aire inerte», el último de los cuales obtuvo removiendo el primero con varios materiales combustibles u oxidables. SCHEELE descubrió además el gas cloro, aunque no lo reconociera como elemento, y una gran cantidad de compuestos inorgánicos y orgánicos (sulfuro de hidrógeno, cianuro de hidrógeno, ácidos túngstico y molíbdico, glicerina, ácidos láctico, málico, tartárico, cítrico, úrico, etc.). El profesor de Química y Farmacia sueco BERGMAN apoyó decididamente a SCHEELE y publicó algunos de sus trabajos.

A PRIESTLEY se le adelantó también BAYEN, creador de la Farmacia militar en Francia. En febrero y abril de 1774, BAYEN publicó dos artículos en la revista *Observations sur la physique*, dirigida por el abate ROZIER, sobre la reducción de las sales y, en especial, del «mercurius precipitatus per se» (óxido de mercurio) por el carbón, en cuyo caso se obtenía aire fijado (dióxido de carbono), y también en ausencia de carbón, en cuyo caso el polvo rojo de óxido de mercurio se reducía igualmente a metal, pero emitiendo un fluido elástico que no se disolvía en agua. BAYEN había descubierto el oxígeno y, aunque no se detuvo mayormente en estudiarlo, fue el primero en atacar directamente la teoría del flogisto. LAVOISIER nunca mencionó los trabajos de REY ni de BAYEN.

En octubre de 1774, PRIESTLEY visitó París y frecuentó el laboratorio de LAVOISIER, relatándole las experiencias que había realizado y que le habían llevado el primero de agosto de aquel año al descubrimiento del oxígeno por vía química. LAVOISIER se aprovechó astutamente de esta visita, y el trabajo que entregó para las «Memoires» de la Academia de Ciencias en abril de 1774 no fue publicado hasta 1777, pero en una versión muy cambiada. LAVOISIER concluyó que, al calcinar el mercurio, la «parte fijable» del aire que

extraía el «mercurius calcinatus» resultante era, de hecho, el «espíritu del nitro», la «parte ácida del aire». En una memoria posterior, recibida en 1777, leída en 1779, y publicada en 1781 con el título *Consideraciones generales sobre la naturaleza de los ácidos y sobre los principios que los componen*, LAVOISIER sugirió, para el «aire puro», «aire vital», o «aire eminentemente respirable», el nombre «principe oxygene», o «principio acidificante». En 1789, en su famoso *Tratado elemental de química*, LAVOSIER cambió su nombre por el de *oxígeno* (del griego, «hacedor de ácidos»), con el que se le conoce hoy universalmente. Este elemento redox y ácido-base, clave en el devenir de la química y la bioquímica, ocuparía el puesto octavo en la Tabla Periódica.

Agua, oxígeno, óxidos y ácidos

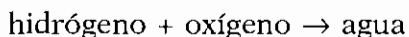
El paso final para la confirmación de la teoría de LAVOISIER contra la teoría del flogisto fue la comprensión de la *composición del agua*, que dejaría de ser el antiguo «elemento» de los griegos para convertirse en el «compuesto» más simple e importante de la química y la bioquímica, el compuesto esencial, sin ninguna duda, de la naturaleza y la biología. Este paso fue inicialmente emprendido por CAVENDISH, que ya en 1766 advirtió que su «aire inflamable» ardía en el aire común, pero sin llegar a identificar el producto de esta combustión. En 1781, PRIESTLEY observó que se condensaba «rocío» en el recipiente en que tenía lugar dicha combustión, haciendo notar que este experimento confirmaba la opinión de WARLTIRE (1766) de que «common air deposits its moisture when phlogisticated». En 1783, el famoso ingeniero e instrumentista escocés WATT, inventor de la máquina de vapor, remitió a la «Royal Society» dos cartas, que fueron leídas en 1784, explicando correctamente el fenómeno observado por PRIESTLEY. CAVENDISH repitió los experimentos de PRIESTLEY y recogió el rocío que se formaba como *producto de la combustión del hidrógeno en el aire*, que resultó ser agua pura.

Puesto que CAVENDISH creía que el hidrógeno era el flogisto y que el oxígeno era aire desflogisticado, explicó la formación del agua como debida a la combinación de ambos gases durante la flogisticación del aire desflogisticado. La razón volumétrica en que se combi-

naban ambos gases era 2:1. Los experimentos de CAVENDISH fueron llevados a cabo en 1781, pero de hecho no fueron publicados hasta 1784 en sus *Experiments on air*. Aparentemente, la razón por la que CAVENDISH retrasó la publicación de sus resultados sobre el agua fue que encontró que se formaba ácido nítrico al hacer saltar la chispa en una atmósfera de hidrógeno en aire. Después, sin embargo, descubrió que el ácido nítrico formado era, de hecho, el producto de la reacción entre el nitrógeno y el oxígeno.

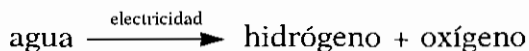
LAVOISIER tuvo noticias de estos experimentos en 1783, a través del médico y químico británico BLAGDEN, ayudante de CAVENDISH y más tarde secretario de la «Royal Society», e inmediatamente realizó en su presencia un crudo experimento quemando hidrógeno en oxígeno y recogiendo el agua formada. Al día siguiente de la realización de este experimento, LAVOISIER envió una memoria a la Academia de Ciencias, pero cuando este trabajo apareció en 1784, en un volumen de las «Mémoires» datado en 1781, había sido ciertamente retocado.

Aunque la «controversia del agua» concluyera asignando a WATT la prioridad en cuanto a la interpretación del fenómeno, no cabía duda de que la mejor demostración experimental acerca de su composición había sido conseguida por primera vez por CAVENDISH y de que la explicación correcta y definitiva del proceso fue dada por LAVOISIER, quien, importa subrayarlo de nuevo, se quedó perplejo al ver que «el compuesto resultante de la combinación del hidrógeno con el oxígeno no era ácido sino neutro». Se había conseguido aclarar la reacción quizás más importante de la Química y la Bioquímica en cuanto a los elementos y compuestos que en ella participan, pero faltaba todavía mucho para precisar, en términos atómicos y moleculares, la estequiometría de la reacción:



En 1800, a las pocas semanas de comunicar el físico italiano VOLTA a la «Royal Society» el invento de su famosa batería eléctrica, el químico inglés NICHOLSON y el fisiólogo, también inglés, CARLISLE utilizaron la «pila de Volta» para descubrir la *electrolisis*, al sumergir los dos electrodos de la pila en agua y observar que ésta se descomponía liberando burbujas de hidrógeno y oxígeno. Se acababa

de poner de manifiesto la *descomposición electrolítica del agua*, una reacción química que siglo y medio después demostraría ser de significación trascendental en Biología:



El mismo año, el mancebo de botica y físico alemán RITTER recogió los gases resultantes de la rotura del agua por la corriente eléctrica y comprobó que estaban en la relación 2:1. Por lo demás, CRUIKSHANK demostraría también en 1800 que la electrolisis del agua conlleva su electroionización simultánea y resulta en la acidificación del medio anódico y en la basificación del medio catódico (términos que, dicho sea de paso, no entrarían en uso hasta mediados del siglo XIX). Estas simples observaciones sobre la síntesis y la descomposición del agua y sobre la relación volumétrica de los gases implicados en dichos procesos pudieron haber evitado, de haberse tenido en cuenta, muchas polémicas y discusiones sobre su composición. Como es bien sabido, la aplicación por DALTON del principio de la máxima simplicidad a su teoría atómica determinó que, hasta pasada la mitad del siglo, se aceptara HO en vez de H₂O como fórmula del agua.

En contraste con la antigua idea de «elemento» de los griegos, el concepto moderno de *elemento químico*, como *sustancia simple que no puede descomponerse* por ningún procedimiento de análisis, se debe fundamentalmente a BOYLE y a LAVOISIER. Para LAVOISIER, «un elemento o principio es el último punto que el análisis puede alcanzar». Esta definición era precavida, pues tenía en cuenta que algunos elementos podían no serlo: «en tanto no hayamos descubierto todavía los medios para separarlos, actúan como sustancias simples, y no debemos considerarlos como compuestos hasta que los experimentos y la observación demuestren que lo son».

Si GALILEO puede ser considerado el padre de la Física moderna, LAVOISIER lo puede ser de la Química. El interés de LAVOISIER por el alumbrado de las vías públicas le introdujo, sin duda, de lleno en el problema de la combustión. Además, LAVOISIER definió la materia por su propiedad de ser pesada e introdujo el uso sistemático de la balanza, a cuyo perfeccionamiento dedicó especial atención. LAVOISIER puso de manifiesto, en primer

lugar, la falacia de que el «elemento agua» se convertía en el «elemento tierra». En su memoria de 1770, publicada en 1773, *Sobre la naturaleza del agua y sobre el experimento que supuestamente ha demostrado la posibilidad de su conversión en tierra*, LAVOISIER presentó los resultados que obtuvo al repetir el experimento que Van HELMONT y otros muchos químicos habían realizado para demostrar que cuando se evapora agua destilada en una vasija de vidrio siempre deja un ligero residuo de tierra, lo que había sido interpretado en el sentido de que parte del agua se convertía en tierra.

En su experimento, LAVOISIER puso agua que había sido destilada ocho veces en una vasija de vidrio, consistente en un alambique provisto de tubos de retorno para condensar el vapor, y pesó exactamente por separado todo el conjunto. Después de calentar el recipiente a 60-70 °R durante 101 días, pesó de nuevo el residuo blanco resultante de la evaporación del agua, así como el propio recipiente de vidrio. El balance ponderal demostró que la «tierra» procedía no del agua utilizada, sino del vidrio de la vasija que la propia agua había disuelto a lo largo del experimento. SCHEELE confirmaría al analizar cualitativamente la «tierra» residual que su composición era consistente con la del vidrio de la vasija.

Después de este sencillo y elegante experimento, LAVOISIER dedicó todos sus esfuerzos a partir de 1772 a probar que el metal, y no la cal, así como el no metal, y no el producto de su combustión, es el verdadero elemento químico, o cuerpo simple; así echó abajo de manera irrefutable la teoría del flogisto. LAVOISIER empezó por calentar sustancias simples al aire: por ejemplo, enfocando los rayos de sol concentrados por una lupa sobre un diamante, observó que éste desaparecía y se transformaba en «ácido carbónico» (dióxido de carbono); además, quemó fósforo y azufre y comprobó que los «ácidos» (de hecho anhídridos) resultantes de la combustión pesaban más que los elementos originales porque habían fijado aire; también calentó metales, como estaño y plomo, y observó que se cubrían de una capa de «óxido» y que las sales resultantes pesaban más que los elementos de partida. Por otro lado, el metal resultante del tratamiento del óxido metálico con carbón pesaba menos que el compuesto original, porque la cal perdía por la acción del carbón aire fijado (dióxido de carbono) durante su reducción.

LAVOISIER no sólo constató que el metal o el elemento combustible aumentaba de peso con la calcinación o combustión porque fijaba aire, sino que el aire de la cámara de reacción perdía peso, y el conjunto lo conservaba. Este mismo tipo de experimentos le permitió llevar a cabo el análisis del aire: el aire que absorbían los elementos al arder o los metales al ser calcinados era el aire vital de Priestley, en tanto que el que quedaba como residuo era el aire méfítico de Rutherford. Con sus experimentos y la correcta interpretación de los mismos, LAVOISIER estableció los fundamentos de la Química moderna.

La nueva teoría química de LAVOISIER, basada fundamentalmente en el rechazo de la teoría del flogisto y en el papel del oxígeno en la generación de «ácidos» con los no metales y de «cales» con los metales, fue sucesivamente aceptada por los químicos franceses BERTHOLLET, en 1785, GUYTON De MORVEAU, en 1786, y FOURCROY, en 1787. Aunque durante el siglo XVII se habían llevado a cabo varios intentos de sistematizar el uso de los términos químicos para denominar las diferentes sustancias, este propósito no fue logrado plenamente hasta 1787, en que GUYTON De MORVEAU, LAVOISIER, BERTHOLLET y FOURCROY publicaron, bajo el patrocinio de la Academia de Ciencias de París, el *Methode de nomenclature chimique*.

El oxígeno fue ¡cómo no! el eje alrededor del cual giró toda la nueva terminología química. Los nombres de las sustancias simples debían, en lo posible, expresar sus características más obvias, y los de los compuestos debían indicar su composición referida a sus constituyentes. Así, los ácidos y las bases se denominaban según los elementos que los generaban, y las sales, de acuerdo con los ácidos y bases de que procedían.

BERTHOLLET fue médico y químico y realizó relevantes contribuciones a la incipiente ciencia de la química, algunas de muy largo alcance. Aunque en su importante trabajo sobre el cloro («ácido marino desflogisticado») aceptó, como antes el sueco SCHEELE, que esta sustancia era compuesta y contenía oxígeno («ácido oximuriático»), fue el primero en demostrar la composición elemental del amoniaco (NH_3), así como en mostrar su *escepticismo sobre la teoría de Lavoisier de que todos los ácidos contienen oxígeno*, pues verificó que el ácido prúsico, o cianuro de hidrógeno (HCN), y el sulfuro de hidrógeno

(H₂S) no son compuestos oxigenados. Su idea, postulada en 1801 y publicada *in extenso* en 1803 en su obra magna *Essai de statique chimique*, de que las concentraciones de los reactivos, o sustratos, rigen el curso de las reacciones químicas y determinan la composición de las sustancias resultantes, o productos, fue, para bien, firmemente rechazada por los grandes químicos de la época, pues hubiera frenado el nacimiento de la teoría atómica, pero al final resultó ser precursora en más de medio siglo de la ley fundamental de acción de masas de WAAGE y GULDBERG (1864).

En su obra cumbre, *Traité élémentaire de chimie* (1789), que tanto había de influir en el desarrollo de la Química moderna, LAVOISIER incluyó una «Tabla de las sustancias simples», la primera que se publicaba en la historia de la Química. En la lista de Lavoisier figuraban 33 elementos, de los cuales sabemos ahora que sólo 23 son, de hecho, elementos químicos. Entre los 10 que no son tales aparecían dos elementos imponderables, la «luz» y el «calórico»; tres radicales («muriático», «fluórico» y «borácico»), que funcionaban como «elementos simples» en los compuestos orgánicos; y cinco «tierras, o cales» (cal, magnesia, barita, alúmina y sílice), cuyos elementos (calcio, magnesio, bario, aluminio y silicio) no se habían aislado aún.

Un aspecto digno de mención fue el acierto de LAVOISIER de no incluir en su Tabla a los álcalis sosa y potasa, pues sospechaba que, como había demostrado BERTHOLLET para el caso del amoniaco, debían ser compuestos y no elementos. Sin embargo, LAVOISIER se equivocó al considerar a la sosa y la potasa no como óxidos sino, por analogía con el amoniaco, como compuestos de nitrógeno. En cuanto a las «sustancias terrosas» precisó: «Es de presumir que las tierras cesarán pronto de ser consideradas como sustancias simples; son las únicas de todos los elementos que no tienen tendencia alguna a unirse con el oxígeno, y estoy inclinado a creer que esta indiferencia por el oxígeno se debe a que ya están saturadas por él».

Por otro lado, merece también atención el hecho de que, después de agrupar certeramente en la segunda clase de su Tabla, como «sustancias simples no metálicas oxidables y acidificables», a los elementos que forman ácidos en su combustión al combinarse con el oxígeno (azufre, fósforo y carbono), tuviese el inexplicable «desliz» de

agrupar a los elementos de la tercera clase (antimonio, plata, arsénico, bismuto, etc.) como «sustancias simples metálicas oxidables y acidificables», en vez de «salificables».

LAVOISIER sabía obviamente mejor que nadie que los metales forman cales, u «óxidos metálicos», en su calcinación al combinarse con el oxígeno. Precisamente él mismo trató largamente, en los Capítulos XVI y XVII de su libro, de las «bases salificables» (tres álcalis —sosa, potasa y amoniaco—, cuatro tierras —cal, magnesia, barita y alumina— y diecisiete sustancias metálicas), así como de las sales neutras que resultan de su unión con los ácidos. Hay pues que atribuir este error no a una confusión conceptual sino quizás a la idea, muy grabada en su subconsciente, de que el oxígeno era constituyente esencial de los ácidos. LAVOISIER no ignoraba que la parte ácida volátil del nitro (ácido nítrico) contenía el «espíritu vital» o «nitro-aéreo». No hay que olvidar tampoco que LAVOISIER, obsesionado por su idea de los ácidos, había buscado sin éxito el que, en su opinión, debía formarse en la combustión del hidrógeno en oxígeno, que, sorprendentemente para él, resultó no sólo no ser un ácido, sino, por el contrario, una sustancia neutra, nada menos que el agua.

LAVOISIER había establecido sin lugar a dudas que la combustión de los elementos no metálicos —que conduce a la formación de ácidos—, así como la calcinación de los metálicos —que conduce a la formación de cales—, obedecía a la misma causa, es decir, a la combinación de dichas sustancias simples con el oxígeno, proceso que hoy conocemos correctamente, en uno y otro caso, como oxidación. Por otro lado, con anterioridad a LAVOISIER, los químicos habían usado la palabra *ácido* (del latín «acidus», que tiene sabor de vino agrio, o vinagre, «acetum») para designar a las sustancias que tienen esta característica y que pueden formar sales combinándose con las bases. Sin embargo, al definir LAVOISIER al *oxígeno* (del griego «oxis», ácido) como *elemento generador de ácidos* se produjo inevitablemente un confusionismo con la aparición de la palabra *óxido*, cuyo uso se limitó al principio a los óxidos metálicos, o cales, y que después se extendería también a los óxidos no metálicos, o ácidos.

Ciertamente, para LAVOISIER, los ácidos (de hecho, anhídridos; por ejemplo, carbónico, CO_2 ; sulfúrico, SO_3 ; fosfórico, P_2O_5) son los compuestos resultantes de la combinación de los no metales con el

oxígeno, a los que, no obstante, no consideró óxidos. Por tanto, aunque, por su etimología, las palabras ácido y óxido son equivalentes, con el tiempo se diferenciarían sus significados, hasta el punto de que hoy ya no se pueden usar indistintamente. Ciertamente, las combinaciones de las sustancias simples no metálicas con el oxígeno son «óxidos ácidos» —lo que no deja de ser una redundancia—, pero las combinaciones de las sustancias simples metálicas con el oxígeno son «óxidos básicos» (lo que es en sí un contrasentido. ¿Cómo puede una sustancia ser un ácido básico?

El químico escocés GRAHAM publicó en 1833 los resultados de sus investigaciones sobre las tres formas de *ácido fosfórico* (*meta*, *piro* y *orto*). La composición del compuesto que se llamaba entonces ácido fosfórico venía expresada por la fórmula PO_5 . GRAHAM demostró que existen tres “hidratos del ácido fosfórico”, a los que asignó la composición $PO_5 HO$, $PO_5 2HO$ y $PO_5 3HO$, respectivamente, sentando las bases de la teoría de la polibasicidad de los ácidos formulada por el químico alemán LIEBIG (1838).

El químico sueco ARRHENIUS propuso definir los ácidos como sustancias hidrogenadas que en solución acuosa producen *iones hidrógeno* (H^+), y las bases como sustancias que en solución acuosa disocian *iones hidróxido* (HO^-). Desde la década de 1880, la evidencia a favor de la *teoría iónica* de ARRHENIUS sobre los ácidos y las bases ha sido enorme. En 1923, el fisicoquímico danés BRÖNSTED y el británico LOWRY propusieron independientemente la hoy bien establecida teoría de que un ácido es una sustancia que tiende a ceder un *protón*, y una base, la que tiende a fijarlo.

En el mismo año de 1923, el fisicoquímico americano LEWIS formuló la teoría de que un ácido es una sustancia aceptora de un *par de electrones*, y una base, una sustancia dadora de un par de electrones. LEWIS también hizo una predicción que, a la luz de los hechos, está completamente justificada: «The cult of the proton has hindered the understanding and extension of the acid concept». Es pues comprensible que la definición del químico alemán LUX (1939) de un ácido como una sustancia que tiende a ganar un *anión óxido*, y de una base como la que tiende a perderlo, haya sido ignorada hasta ahora por los bioquímicos, a pesar de su importancia fundamental en bioenergética.

Hoy, el término *oxidación* se relaciona tanto con la combustión de los no metales como con la calcinación de los metales y es común a ambos procesos, pero en tanto conlleva una «acidificación», remachando el término, en el primer caso, en el segundo implica una «básificación», término que contradice, en principio, al de oxidación entendido en el sentido de acidificación. El recién aparecido *Diccionario de la Lengua Española* (1994) no escapa a esta ambigüedad al definir a un óxido como «la combinación del oxígeno con un metal, generalmente, y a veces con un metaloide, la cual se distingue de los ácidos por no ejercer acción sobre la tintura de tornasol, en unos casos, y en otros, por devolver el color azul a la que previamente fue enrojecida».

En la Química actual, un óxido es un compuesto binario de oxígeno y cualquier otro elemento. Los óxidos son, de hecho, los componentes más abundantes y característicos de la hidrosfera y la litosfera, siendo el oxígeno el elemento químico más abundante en la corteza terrestre. La hidrosfera está constituida fundamentalmente por agua —óxido de hidrógeno—, y la litosfera, por óxidos, tanto simples como complejos. Los óxidos complejos, u óxidos de varios elementos, son los más abundantes, y su estudio abarca la mayor parte de la mineralogía.

Los óxidos se clasifican comúnmente en óxidos ácidos, óxidos básicos, óxidos anfóteros y óxidos neutros. Los *óxidos ácidos*, a los que LAVOISIER consideró simplemente ácidos, resultan de la unión de un no metal (C, N, P, S) con el oxígeno y se combinan con los óxidos básicos para formar sales. En solución acuosa tienen carácter ácido. Los *óxidos básicos* resultan de la unión de un metal con el oxígeno y, en solución acuosa, forman hidróxidos, que, al perder el agua por la acción del calor, regeneran los óxidos básicos anhídros. Los *óxidos anfóteros*, como los de cinc y aluminio, se comportan como ácidos frente a las bases, dando cincatos y aluminatos, y como bases frente a los ácidos, dando las sales de cinc y aluminio de éstos. Finalmente, los *óxidos neutros*, como el agua, el monóxido de carbono o el óxido nítrico, no forman sales ni dan soluciones acuosas ácidas o básicas.

Hemos analizado con algún detalle los aspectos históricos de la función del oxígeno en la formación de ácidos y bases pues, por un lado, hoy yacen en el olvido las razones equívocas pero determinan-

tes que condujeron a LAVOISIER hace dos siglos a denominar así este elemento y, por otro, estas mismas razones vuelven a cobrar la máxima actualidad y trascendencia al ser examinadas a la luz de los nuevos acontecimientos. El oxígeno desempeña, ciertamente, un doble papel fundamental en Biología, tanto en las reacciones ácido-base como en las reacciones redox. LAVOISIER cometió obviamente un error al denominarlo con ese nombre, identificando su función con la generación de ácidos y el carácter de éstos, pero, al mismo tiempo, fue clarividente al asociar los procesos de oxidación y acidificación. En concreto, hoy podemos decir que la función del anión óxido (un átomo de oxígeno reducido por la captación de dos electrones), actuando como base, puede ser clave en el mecanismo de la fosforilación, un aspecto ignorado hasta ahora en la bioquímica de este elemento. Como hemos adelantado en la introducción, el fuerte carácter básico del *anión óxido* (O^{2-}) y el fuerte carácter oxidante del *dioxígeno* (O_2) son las cualidades más significativas y genuinas de este primordial elemento en Bioenergética.

Fermentación, fotosíntesis y respiración

ARISTÓTELES había llegado a la conclusión de que la función de las hojas era la de dar sombra a los delicados brotes de la planta, y dedujo de sus observaciones que los vegetales, a diferencia de los animales, tomaban sus alimentos de la *tierra*, su estómago gigante, en forma predigerida. Casi veinte siglos más tarde, y como resultado de su famoso experimento, Van HELMONT postuló que el *agua* es el «elemento» básico de la materia vegetal. Según Van HELMONT, las plantas —así como todos los seres vivos, que se nutren de ellas— se componen exclusivamente de agua. Esta sustancia (H_2O) resultaría finalmente ser un compuesto químico de dos bioelementos gaseosos primordiales (H_2 y O_2).

Aparentemente fue HALES el primero en reconocer a comienzos del siglo XVIII que una fracción del *aire* contribuye a la nutrición de las plantas, por lo que figura con Van HELMONT como fundador de la Fisiología vegetal. HALES fue también el primer científico en apreciar el efecto directo de la *luz* solar en la nutrición vegetal: «And may not light also, by freely entering the expanded surfaces of leaves and

flowers, contribute much to the ennobling the principles of vegetables». HALES estudió en Cambridge y fue influenciado profundamente por las ideas de NEWTON sobre la luz, cuyos corpúsculos elementales, que hoy llamamos fotones, podrían transferir «energía» a los cuerpos.

Pero los británicos, maestros de la ironía y del sarcasmo, no podían aceptar así como así las extravagantes ideas de los sabios de la «Royal Society» de que las plantas captan y almacenan la luz del Sol. El famoso escritor satírico Jonathan SWIFT los ridiculizó mordaz y despiadadamente en su magistral libro *Gulliver's travels* (1726) al relatar su visita a la Gran Academia de Lagado: «Every room hath in it one or more projectors, and I believe I could not be in fewer than five hundred rooms. The first man I saw had been eight years upon a project for extracting sunbeams out of cucumbers, which were to be put into vials hermetically sealed, and let out to warm the air in raw inclement summers. He told me, he did not doubt in eight years more, he should be able to supply the Governor's garden with sunshine at a reasonable rate». La imaginación sarcástica del autor se vería más tarde ampliamente desbordada por la evidencia —curiosamente, y valga la redundancia, evidente a todas luces al hombre desde milenios al ver arder la madera— de que las plantas son efectivamente los grandes colectores de los rayos solares, cuya energía almacenan en el propio material que sintetizan a sus expensas.

El primero en establecer en 1771 que *las plantas* purifican el aire en la luz, produciendo *oxígeno*, en tanto que los animales lo vician, produciendo dióxido de carbono y cerrando el ciclo, fue PRIESTLEY, al que sin embargo pasó desapercibida la acción de la luz. El holandés INGENHOUSZ, a la sazón médico de Corte de la emperatriz María Teresa de Austria, se interesó tanto por el hallazgo de PRIESTLEY que, a la primera ocasión que se le presentó, alquiló una casita de campo cerca de Londres en el verano de 1779 y después de verificar con constancia y cuidado admirables más de quinientos experimentos rigurosos publicó inmediatamente un libro sobre sus resultados, concluyendo que las plantas, o mejor dicho, los tallos y las *hojas verdes* de las mismas, poseen el gran poder de purificar el «aire malo», pero sólo cuando están expuestas a la *luz del Sol* y según la claridad del día. Las plantas contaminan el ambiente con «aire nocivo» tanto en la luz como en la oscuridad, pero cuando están iluminadas el desprendimiento de

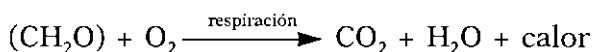
«aire depurado» excede a su consumo. Lo que permite a las plantas purificar su entorno es la luz solar y no su ardor: «The production of the dephlogisticated air from the leaves is not owing to the warmth of the Sun, but chiefly, if not only, to the light».

En 1782, sólo tres años después del trabajo de INGENHOUSZ, el pastor de la ciudad de Ginebra SENEBIER publicó sus memorias sobre la capacidad del reino vegetal para restaurar el aire por influencia de la luz solar, haciendo notar que el «aire fijado», o *ácido carbónico*, es el nutriente que las plantas utilizan y la fuente del «aire puro», u oxígeno, que liberan.

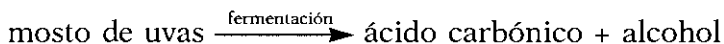
Por su parte, los estudios de LAVOISIER aclararon definitivamente en la década de 1780 la *química y energética de la respiración* y su semejanza con la calcinación y la combustión: «La respiración no tiene acción más que sobre la porción de aire puro, el aire eminentemente respirable, contenido en el aire atmosférico; el excedente, o sea, la parte mefítica, es un medio puramente pasivo que entra y sale de los pulmones más o menos en las mismas condiciones, es decir, sin haber experimentado cambios mayores. El aire que queda después de la calcinación de los metales no difiere en nada del que queda después de la respiración de los animales, siempre que éste último haya sido despojado por la cal o por los álcalis cáusticos de su parte fijable».

LAVOISIER, sin embargo, se equivocó en su conclusión de que la respiración tiene lugar en los pulmones, donde se genera el *calor* que el proceso respiratorio conlleva: «La respiración es, por tanto, una combustión, en verdad muy lenta, pero por otra parte totalmente semejante a la del carbono, y se efectúa en el interior de los pulmones sin originar luz porque la materia del fuego liberada es inmediatamente absorbida por la humedad de estos órganos. El calor desarrollado en esta combustión se comunica a la sangre que atraviesa los pulmones, y de ahí se extiende por todo el sistema animal». El ayudante de LAVOISIER, HASSENFRAZ, que lo fue después de LAGRANGE, se refirió en una de sus publicaciones a la opinión discordante de este físico respecto a la de LAVOISIER, en el sentido de que, si el calor de la respiración se libera completamente en el pulmón, la temperatura local de este órgano debería ser mucho más alta que la de las demás partes del cuerpo, lo cual estaba en contradicción con los hechos.

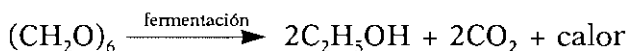
LAVOISIER acertó, en cambio, al concluir que el consumo de oxígeno durante la respiración aumenta con el *ejercicio físico* y que no sólo el *carbono* contenido en las sustancias orgánicas se combina con el *oxígeno* para dar *ácido carbónico*, sino también el *hidrógeno* para dar *agua*: «Independientemente de la porción de aire vital que se convierte en ácido carbónico, una porción del que entra en los pulmones no vuelve a salir en el mismo estado; de lo cual que en el acto de la respiración resulta una de dos, o que una porción del aire vital se une con la sangre, o bien que se combina con una porción de hidrógeno para formar agua». La ecuación de la respiración quedó pues claramente definida por LAVOISIER, aún antes de que el fisicoquímico escocés DALTON hubiese formulado su teoría atómica y el químico sueco BERZELIUS hubiera asignado símbolos a los elementos; en términos químicos modernos podemos escribir:



A LAVOISIER se debe igualmente la ecuación química de la *fermentación*, la primera en la historia de la Química:



que hoy podemos también escribir en los siguientes términos:



Al discutir la *fermentación* del azúcar en alcohol y ácido carbónico, LAVOISIER concluyó: «Nada se crea en las transformaciones artificiales o naturales, pudiéndose aceptar como un axioma que, en cualquier proceso, la misma cantidad de materia existe antes que después de realizarse la operación y que la calidad y cantidad de los principios permanecen iguales, ocurriendo sólo cambios y modificaciones. Todo el arte de hacer experimentos en química se funda en este principio: tenemos siempre que suponer una igualdad o ecuación exacta entre los principios del cuerpo examinado y los de los productos de su análisis».

De acuerdo con este principio, que le permitió formular la *ley de conservación de la masa*, LAVOISIER reconoció la significación de su

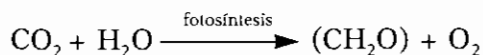
acierto al constatar: «Se puede considerar que las sustancias que experimentan la fermentación y los productos que resultan de esta operación forman una ecuación algebraica y que, si suponemos de manera sucesiva que desconocemos uno de los elementos en esta ecuación, podemos calcular uno tras otro el valor de cada uno de ellos y, por tanto, comprobar nuestros experimentos mediante el cálculo y, recíprocamente, nuestros cálculos mediante la experimentación. Yo he empleado a menudo este método con éxito para corregir los primeros resultados de mis experimentos y para seguir el camino correcto al repetirlos con el fin de mejorarlos».

Los principales trabajos de LAVOISIER sobre el calor fueron efectuados con LAPLACE y SEGUIN y pusieron los cimientos de la termoquímica, tanto en sus aspectos teóricos como prácticos. Si bien es cierto que estos científicos franceses no dieron crédito al químico escocés BLACK, verdadero fundador de la calorimetría, también lo es que fabricaron un calorímetro mucho más perfecto que el de éste, lo que les permitió, valiéndose de la licuación de la nieve, realizar importantes medidas para determinar no sólo el calor que se produce en las reacciones químicas (disolución de ácido sulfúrico en agua, detonación del salitre con carbón, combustión del fósforo) sino el calor que se genera en los procesos fisiológicos (respiración de un cobaya). Midiendo en el calorímetro el hielo fundido, y comparando la cantidad de anhídrido carbónico producido en la respiración de un cobaya y en la combustión del carbono, pudieron comprobar que ambos procesos son equivalentes. El reconocimiento de la composición del anhídrido carbónico y del agua, así como de que las sustancias orgánicas (azúcar, alcohol, aceite, cera) se componen de carbono, hidrógeno y también oxígeno, permitió a LAVOISIER —quemándolas y pesando los sustratos y productos de la combustión— establecer su análisis elemental.

En su libro *Essays on the food of plants and the renovation of soils*, publicado en 1796, INGENHOUSZ utilizó la nueva nomenclatura de LAVOISIER en relación con la función de las plantas: «They absorb from carbonic acid in the sunshine, the carbon, throwing out at that time the oxygen alone and keeping the carbon to itself as nourishment». Finalmente, en 1804, otro experimentador cuidadoso de la culta ciudad de Ginebra, el químico De SAUSSURE, encontraría, al realizar rigurosas medidas cuantitativas, el cuarto y último ingrediente de la *química de la fotosíntesis*: el agua.

De SAUSSURE demostró que, mientras asimilan dióxido de carbono, las plantas aumentan su peso en una cantidad mayor que la que pueden obtener de este gas y concluyó que se apropian del oxígeno e hidrógeno del agua, que pierde así su estado líquido. El químico suizo corroboró así, en cierto modo, los experimentos originales de Van HELMONT de dos siglos antes, que habían llevado a este gran pionero de la experimentación bioquímica y fisiológica a concluir que el agua era el compuesto clave del proceso. De SAUSSURE enfatizó, sin embargo, también que el oxígeno desprendido por las plantas procedía del CO_2 y no del H_2O , relegando a ésta a un papel relativamente secundario en el proceso: «Las plantas se apropian de los elementos hidrógeno y oxígeno del agua. En ningún caso, sin embargo, las plantas descomponen directamente el agua al asimilar el hidrógeno y eliminar el oxígeno como gas. Nunca liberan oxígeno excepto como consecuencia de la descomposición directa del ácido carbónico».

Durante siglo y medio sería «dogma» entre los expertos que *el oxígeno* desprendido por las plantas verdes en la fotosíntesis *procedía de la fotólisis del dióxido de carbono* en carbono y oxígeno, en tanto *el agua desempeñaba un papel* más bien complementario y pasivo *en la hidratación a carbohidrato del carbono* resultante del proceso fotolítico:



Es una gran lección para los científicos de hoy reflexionar sobre la enorme cantidad de aciertos y errores cometidos a lo largo de la historia de la Ciencia por los investigadores de primera fila al interpretar unas ecuaciones tan simples e importantes como las de la fotosíntesis y la respiración. Con dichas ecuaciones quedaba aparentemente explicado en términos químicos globales, que no energéticos ni bioquímicos, el ciclo fotosíntesis-respiración (descubierto por PRIESTLEY, INGENHOUSZ y LAVOISIER y completado por SENEBIER y De SAUSSURE) que cierran plantas y animales, al purificar aquéllas en la fotosíntesis el aire de la atmósfera viciado por éstos en la respiración.

La *clorofila*, el «pigmento verde de las hojas», fue aislado en 1817 por los farmacéuticos y químicos orgánicos franceses PELLETIER y CAVENTOU. Mediante la extracción con disolventes suaves, PELLE-

TIER y CAVENTOU consiguieron también aislar de las plantas numerosas drogas (cafeína, estricnina, quinina, colchicina, etc.), por lo que se les considera fundadores de la química de los alcaloides. Curiosamente, hasta 1823 creyeron que los alcaloides —que ahora se definen como sustancias nitrogenadas— no contenían nitrógeno.

El eminente fitofisiólogo alemán SACHS estableció en 1865 que la clorofila no se distribuye uniformemente por la planta sino que se localiza en los orgánulos celulares denominados «cuerpos clorofílicos» y más tarde *cloroplastos*; estos orgánulos son de hecho equivalentes, como ha sido propuesto en época reciente, a las células procarióticas fotosintéticas de las algas verde-azuladas. SACHS demostró también que la asimilación fotosintética del dióxido de carbono por las plantas ocurre en los cloroplastos y conduce a la síntesis de *almidón*. Cuando a SACHS le objetaron que los cloroplastos sólo pueden realizar la función clorofílica «dentro» de la célula viva y que, en consecuencia, no deben ser considerados como los orgánulos de la asimilación del carbono, replicó que ello era equivalente a decir que el ojo no es el órgano de la visión porque no puede ver cuando está «fuera» de la cuenca ocular. SACHS confirmó también la conclusión de INGENHOUSZ de que las plantas, al igual que los animales, respiran, consumiendo oxígeno y desprendiendo dióxido de carbono.

El también insigne fisiólogo alemán ENGELMANN demostró, utilizando como técnica microscópica extraordinariamente sensible la motilidad de ciertas bacterias en presencia de trazas de oxígeno, que el desprendimiento de este elemento por las plantas durante la fotosíntesis se debe a la absorción de la luz por la clorofila y tiene lugar, efectivamente, en los cloroplastos. ENGELMANN puso además de manifiesto la correspondencia entre el *espectro de acción de la fotosíntesis* y el *espectro de absorción de la clorofila*, estableciendo que la luz roja y azul que absorbe el pigmento son las únicas que promueven activamente el proceso. ENGELMANN hizo otro descubrimiento fundamental en 1881, cuya significación no fue entonces debidamente valorada a pesar de tratarse de la reacción más trascendental, desde el punto de vista bioenergético, de toda la Biología: el desprendimiento de oxígeno molecular por preparaciones de *cloroplastos aislados* de diversas plantas. Otro descubrimiento insólito, el de las *bacterias fotosintéticas* purpúreas, que no producen oxígeno durante la fotosíntesis, fue también realizado por ENGELMANN en 1883.

El mineralogista y químico francés BOUSSINGAULT, descubridor de la fijación del nitrógeno atmosférico por las leguminosas y autor de un texto comprensivo de Química agrícola en ocho volúmenes, hizo en 1864 el descubrimiento de que el *cociente fotosintético* —o relación entre el volumen de oxígeno desprendido y el de dióxido de carbono absorbido— es igual a la unidad: $O_2/CO_2 = 1$. En 1905, el fitofisiólogo inglés BLACKMAN publicó el trabajo clásico *Optima and limiting factors*, poniendo de manifiesto que, cuando un proceso depende de varios factores independientes —como son intensidad de luz, concentración de CO_2 , temperatura, etc. en la fotosíntesis—, su velocidad está limitada por el paso más lento, o «factor limitante». Este trabajo fue precisamente estimulado por las investigaciones de uno de sus estudiantes, que demostró que la *temperatura* no ejerce ningún efecto sobre la actividad fotosintética a baja intensidad luminosa, pero la incrementa notablemente a alta intensidad.

La *función energética de la luz* en la fotosíntesis —intuida por NEWTON y HALES y demostrada por INGENHOUSZ— fue aclarada últimamente por el médico y físico alemán MAYER, hijo de farmacéutico, en 1845, tres años después de enunciar el principio de conservación de la energía: «Las plantas son capaces de absorber y convertir la energía pero no de crearla. La naturaleza se ha impuesto a sí misma la tarea de cómo cazar al vuelo la luz que fluye hacia la Tierra y de almacenar la más elusiva de todas las energías de forma estable. Para conseguir este propósito ha cubierto la corteza de la Tierra de organismos que en sus procesos vitales absorben la luz del Sol y utilizan su energía para producir continuamente una acumulación de diferencia química. Estos organismos son las plantas; el reino vegetal constituye la despensa en que los fugaces rayos solares son fijados y almacenados para su uso posterior: una medida económica providencial a la que va inexorablemente unida la propia existencia física de la raza humana».

MAYER estaba familiarizado con las ideas de LAVOISIER de que el calor animal tiene su origen en la respiración de los alimentos por el oxígeno y de que este elemento es necesario para el ejercicio físico, pero era consciente de que las ideas de LAVOISIER sobre el calor no habían sido tan claras como respecto al flogisto y al aire desflogisticado. De hecho, LAVOISIER acuñó el término «calórico» para designar lo que consideró la «materia imponderable del calor». MAYER

debió concluir también que LAVOISIER erró igualmente al considerar a la luz como un elemento químico.

En 1866, el físico austriaco BOLTZMANN, muy ligado al segundo principio de la termodinámica y a la mecánica estadística, expresó la importancia del proceso de conversión de energía de la fotosíntesis en los siguientes términos: «La lucha universal por la existencia en el mundo vivo no es una lucha por materias primas —ya que todos los organismos las pueden encontrar en abundancia en el aire, agua o suelo—, sino una lucha por la entropía disponible en la transferencia de energía del Sol caliente a la Tierra fría. Las plantas verdes extienden la enorme superficie de sus hojas para aprovechar al máximo esta transición y convierten, por medio de procesos todavía desconocidos, la energía del Sol, antes de que se enfríe a la temperatura de la Tierra, en energía química. Las síntesis químicas que tienen lugar son todavía un misterio para nosotros en nuestros laboratorios, y los productos de estas cocinas químicas constituyen el botín por el que pelea el reino animal».

La energética del proceso fotosintético de asimilación del dióxido de carbono y desprendimiento de oxígeno es lógicamente inversa de la del proceso respiratorio de oxidación de los hidratos de carbono por el oxígeno. En otras palabras, la reacción de reducción del anhídrido carbónico a carbohidrato es fuertemente endotérmica, es decir, conlleva un fuerte aumento de entalpía, así como una ligera disminución de entropía, y requiere una gran cantidad de energía libre para satisfacer el requerimiento endérgico para ambos propósitos.

Que la *fermentación alcohólica* es un proceso biológico fundamental que requiere la presencia de levadura fue descubierto en 1836 por el fisiólogo alemán SCHWANN, padre de la teoría celular, e, independientemente, por el físico e ingeniero francés CAGNIARD De La TOUR, célebre ya por sus estudios sobre el estado crítico de líquidos y vapores (1822). Ambos científicos propusieron que la conversión del azúcar en alcohol y dióxido de carbono es una función fisiológica de la levadura, que aparece como planta microscópica durante la fermentación.

La teoría biológica de la fermentación fue duramente atacada por tres de los más famosos químicos de la época —LIEBIG, WÖHLER y BERZELIUS—, quienes mantuvieron a rajatabla que la fermentación, así como la putrefacción, eran procesos puramente químicos. Ya en

1835, BERZELIUS había formulado la teoría de que todas las reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos son llevadas a cabo por catalizadores biológicos. El trabajo de SCHWANN fue severamente criticado por LIEBIG y WÖHLER en una publicación aparecida en 1839, lo que le forzó a dejar Alemania y trasladarse a Bélgica, primero a Lovaina y después a Lieja, como profesor de Anatomía. Su brillante carrera como fisiólogo cesó virtualmente desde entonces, y su trabajo sobre la dependencia de la fermentación de la actividad de las células vivas de la levadura no sería reivindicado hasta la década de 1850 por el genial químico y microbiólogo francés PASTEUR.

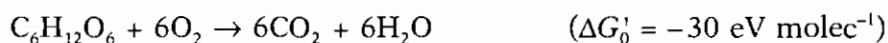
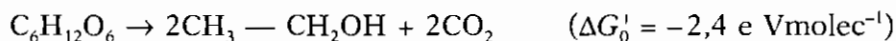
En la historia de la bioquímica es famosa la disputa que mantuvieron LIEBIG y PASTEUR sobre la naturaleza de las fermentaciones. Los químicos no vitalistas, liderados por LIEBIG, fueron, en principio, derrotados por los vitalistas, capitaneados por PASTEUR. Ciertamente fue el infatigable y lúcido PASTEUR quien, entrenado en su carrera como químico, convenció finalmente al mundo científico de que todos los procesos fermentativos son el resultado de la actividad biológica de los microbios. En 1856 inició sus trabajos sobre la fermentación láctica de la leche, demostrando que la formación de ácido láctico requería también la presencia de microorganismos, si bien diferentes de los que producen la fermentación alcohólica del azúcar. Cada tipo químico de fermentación iba indefectiblemente acompañado del desarrollo de un tipo de microorganismo específico. PASTEUR no intentó el estudio detallado de los procesos de putrefacción, convencido probablemente de que eran químicamente mucho más complejos que los de la fermentación.

En sus estudios sobre la fermentación, PASTEUR descubrió en 1861 otro fenómeno biológico fundamental: la existencia de formas vivas que pueden vivir en ausencia de oxígeno libre. En contraste con las levaduras y las bacterias lácticas, las bacterias de la fermentación butírica sólo pueden vivir en ausencia de oxígeno molecular, gas considerado hasta entonces esencial para la vida. PASTEUR introdujo los términos *aerobiosis* y *anaerobiosis* para designar la vida en presencia y en ausencia de aire, respectivamente.

PASTEUR fue el primero en comprender que *la fermentación es vida sin aire*, en tanto que *la respiración es vida con aire*. Ambos procesos son esenciales para la obtención de energía fisiológica. Algunos

organismos, como las bacterias del ácido butírico, son anaerobios obligados, pues dependen estrictamente de la fermentación para obtener energía fisiológica. Otros muchos organismos, como las levaduras, son aerobios facultativos y pueden utilizar «alternativamente» dos mecanismos para obtener energía: en ausencia de oxígeno utilizan la fermentación, mientras que en presencia de oxígeno se valen de la respiración. La mayoría de los organismos son aerobios, y utilizan el oxígeno libre para oxidar los compuestos orgánicos de que se alimentan a dióxido de carbono y agua. Con su habitual clarividencia, PASTEUR demostró que, en ausencia de aire, la levadura transforma el azúcar en alcohol y dióxido de carbono, en tanto que, en presencia de aire, no se forma alcohol, o muy poco, siendo el CO₂ el principal producto de la respiración.

PASTEUR fue también el primero en demostrar que, para una misma cantidad de azúcar, el crecimiento de la levadura es sustancialmente menor en condiciones anaeróbicas que aeróbicas, o en otras palabras, la fermentación es relativamente ineficaz como proceso metabólico para la obtención de energía, en tanto que la respiración es muy eficaz. Hoy sabemos que durante la fermentación sólo se hace uso de una mínima parte de la energía que pueden suministrar los sustratos fermentables, quedando la mayor parte en los productos orgánicos finales de la fermentación, en tanto que en la respiración se utiliza toda la energía disponible. Así, por ejemplo, en el caso de la fermentación alcohólica y de la respiración de la glucosa, el cambio de energía libre que implica el pertinente proceso es más de diez veces mayor en aerobiosis que en anaerobiosis:



Fragmentación de células, átomos y moléculas

Aunque las ideas de LAVOISIER sobre fermentación, respiración y fotosíntesis, postuladas a finales del siglo XVIII, habrían de marcar un hito en la historia de la bioenergética, es obvio que los bioquímicos no pudieron avanzar a fondo en el esclarecimiento de los meca-

nismos de estos procesos hasta un siglo más tarde, cuando la integridad de la célula y de los átomos dejó de ser un obstáculo para investigar sus entresijos a niveles más inferiores, y el calor, la electricidad, el magnetismo, la luz y la energía química y nuclear empezaron a dejar de ser misterios para los científicos.

Resulta en cierto modo paradójico que la Química biológica moderna naciera con enorme ímpetu a finales del siglo XIX al demostrar los bioquímicos que un proceso fisiológico tan peculiar y bien definido como la fermentación alcohólica, conocido desde los tiempos bíblicos, puede ocurrir, después de destruir la estructura e integridad celular, al margen de la célula viva. En este sentido, hay un evidente paralelismo con el nacimiento de la Química moderna, al conseguir los físicos disociar los átomos por acción de la descarga eléctrica a través de gases enrarecidos y descubrir el electrón, el protón y los iones positivos como sus constituyentes. La demostración de que átomos y células —las unidades estructurales y funcionales indivisibles de la materia y de los seres vivos, en cuanto a esencia e individualidad— son, a su vez, susceptibles de disociación, fragmentación y estudio a niveles más inferiores —subcelulares, moleculares, atómicos y de partículas— no hizo derrumbarse, ni mucho menos, la esencia de la Química ni de la Biología, sino que las enriqueció y vigorizó enormemente. Con el desguace de átomos, moléculas y células, y con el análisis a fondo de sus piezas, iba a comenzar una nueva era.

La distinción entre «fermentos organizados», como los de la levadura, que sólo actúan en el interior de la célula viva, y «fermentos desorganizados», como los digestivos, que trabajan fuera de la célula, había sido una solución salomónica a una agria controversia, que no se resolvería hasta finales del siglo, cuando se esclarecieron definitivamente los hechos. Era obvio que existía una zona fronteriza ambigua entre ambos tipos de fermentos, y el eminente fisiólogo francés Claude BERNARD trató de aclarar este aspecto en 1875.

Se había demostrado que las células de levadura contenían el fermento invertasa, capaz de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructosa. Se trataba de un fermento soluble, como los digestivos de animales y plantas, que conservaba su actividad después de ser extraído de las células. ¿Podría la levadura contener también otro enzima específico responsable de la conversión de azúcar en alcohol y dióxido de

carbono que pudiera ser extraído igualmente de las células en forma soluble? Esta posibilidad, sugerida por BERNARD poco antes de su muerte, dio motivo a una enconada discusión entre PASTEUR y los discípulos de BERNARD, pero hasta 1897 no pudo lograrse una prueba directa que demostrara definitivamente que hay fermentación alcohólica fuera de la célula viva.

LIEBIG mantuvo tenazmente hasta el fin de su vida, en 1873, sus ideas sobre la teoría química de la fermentación. BERNARD murió en 1878 sin poder corroborar plenamente su brillante premonición, y PASTEUR moriría en 1895 convencido de haber demostrado inequívocamente que las fermentaciones son procesos vitales inseparables de la actividad de las células vivas. Como en el caso de la «generación espontánea» y del «origen de la vida», el triunfo aparentemente definitivo y contundente de los vitalistas sobre los mecanicistas sería, paradójicamente, sólo parcial y transitorio. Al final, todos tendrían parte de razón, y solamente la ciencia y la verdad inmutable e irrefutable tendrían toda la razón.

La fecha de 1897 es clave en la historia de la Biología y de la Química. En dicho año, el químico alemán Eduard BUCHNER, ayudante de Von BAEYER, descubrió de manera casual la *fermentación del azúcar por extractos de levadura sin células* y, por otro lado, el físico inglés Joseph THOMSON descubrió el electrón y determinó la razón carga/masa de esta partícula subatómica en un experimento que hizo época y que repetiría años más tarde con el protón y otros iones positivos de diversos elementos.

Como tantas veces ha ocurrido en la historia de la Ciencia, la casualidad favorece a los hombres bien dotados y capaces. Hans BUCHNER, hermano mayor y tutor de Eduard, era bacteriólogo y profesor de Higiene en Munich y había preparado jugos acelulares de microorganismos con fines terapéuticos, recurriendo, para evitar su descomposición, al remedio casero de añadir azúcar a los extractos de levadura de cerveza. Durante un viaje a Munich en periodo de vacaciones para visitar a su hermano Hans, Eduard —que ya en su primer trabajo había patentizado su interés por la fermentación alcohólica, al demostrar que la ausencia de oxígeno no era un requisito indispensable para este proceso— observó que se formaba gas en el líquido azucarado libre de células e inmediata-

mente atribuyó el fenómeno a la descomposición del azúcar en dióxido de carbono y alcohol por la acción del principio activo de la levadura, al que llamó «zimasa», o complejo de enzimas endocelulares. Su sensacional ensayo *La fermentación alcohólica sin levadura* (1897) dio nacimiento a la Enzimología (del griego «enzima», en la levadura).

No es superfluo reflexionar sobre el hecho de que los enzimas, que obviamente no tienen sexo, sí tienen género, aunque ambiguo, según el Diccionario de la Real Academia de la Lengua, y, por tanto, discutible si masculino, femenino o neutro. El profesor Alberto SOLS, pionero de la Enzimología en nuestra patria, que consagró gran parte de su vida al estudio de los enzimas de la glicolisis (rotura enzimática de las moléculas de los azúcares), gustaba usar el género masculino, siguiendo el ejemplo de algunas otras palabras similares en este sentido, como enigma, estigma, estoma, más bien que encina, escama, esponja. Uno de los primeros trabajos en España de M. LOSADA, a su vuelta del Laboratorio Carlsberg, en colaboración con M. ROSELL, fue la identificación en extractos de numerosas especies de levadura de una variedad de kinasas específicas de azúcares por un ingenioso micrométodo ideado por SOLS. La fotografía del pocillo de pintor, mostrando los diferentes colores de los ensayos, ocupó siempre un puesto preferente entre los numerosos cuadritos instructivos que decoraban la pared de su despacho.

El descubrimiento de Eduard BUCHNER habría de ser de enorme transcendencia, pues derribaba uno de los dogmas más firmes de la biología en aquel periodo, fundado nada menos que en la autoridad de PASTEUR, quien en 1857 había demostrado —corroborando los anteriores resultados de SCHWANN— que la fermentación se debe a la acción de diminutos organismos y había concluido que la actividad vital es inseparable de la integridad estructural de la célula viva. De hecho, el descubrimiento de BUCHNER supuso un golpe aún más duro para la teoría del vitalismo que el que le asestara el químico alemán WÖHLER en 1828 al sintetizar la urea por calentamiento de una sal amónica.

A partir de los descubrimientos de BUCHNER, por un lado, y de THOMSON, por otro, los avances en Bioenergética fueron tan rápidos y espectaculares que resulta sorprendente encontrar una lista tan

nutrida de científicos galardonados con el premio Nobel en esta rama básica de la Bioquímica: BUCHNER; WILLSTÄTTER; NERNST; A. HILL y MEYERHOF; WIELAND; Von EULER-CHELPIN y HARDEN; H. FISCHER; WARBURG; SZENT-GYÖRGYI; Carl y Gerty CORI; H. KREBS y LIPMANN; THEORELL; OCHOA y KORNBERG; TODD; CALVIN; K. BLOCH y LYNEN; WOODWARD; WALD; EIGEN, NORRISH y PORTER; LELOIR; SUTHERLAND; MITCHELL; BERG; DIESENHOFER, HUBER y MICHEL; MARCUS; E.H. FISCHER y E. KREBS; BOYER, WALKER y SKOU.

El bioquímico británico HARDEN demostró en 1904 que la actividad de la zimasa de la levadura se perdía por diálisis y que las pequeñas moléculas que difundían a través de la membrana semipermeable conservaban su actividad después de calentar a ebullición. HARDEN llamó «cofermento» al *cofactor termoestable* de la «zimasa» de BUCHNER, pero no prosiguió su estudio, que sería continuado por el bioquímico germano-sueco Von EULER-CHELPIN, que llamó «cozimasa» al cofactor. Esta fue la primera evidencia de la existencia de *coenzimas*, o moléculas no proteicas esenciales para la actividad de los *enzimas termolábiles*. El nombre de coenzima había sido acuñado en 1897 por el químico y biólogo francés BERTRAND.

El papel vital del átomo de fósforo en el metabolismo fue también advertido en el año 1905 por HARDEN al demostrar que la pérdida de la actividad con el tiempo de los extractos de levadura no se debía a la demolición de los enzimas, sino a que *la fermentación alcohólica requiere fosfato inorgánico*, que ejerce su acción a través de la formación de ésteres fosforilados de azúcares (fructosa-bisfosfato, o éster de HARDEN-YOUNG). HARDEN estudió además el efecto del arseniato sobre la fermentación, observando que, a pesar de ser este compuesto muy similar químicamente al fosfato, se comportaba de modo distinto. Según sus propias palabras: «an undeserved reward for thinking chemically about a biochemical problem, a dangerous thing to do». HARDEN compartió el premio Nobel de Química de 1929 con Von EULER-CHELPIN, que en 1923 demostró la estructura molecular del coenzima redox NAD de la levadura.

En 1918, el bioquímico alemán-estadounidense MEYERHOF demostró que la transformación de la glucosa, resultante de la demoli-

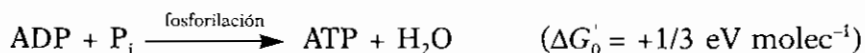
ción del glucógeno a ácido láctico, tenía lugar en el músculo sin el consumo de oxígeno, es decir, anaeróbicamente. Para el año 1933, tanto MEYERHOF como el fisiólogo alemán EMBDEN y otros muchos químicos dejaron establecidos en detalle los pasos metabólicos implicados en la glicolisis y la fermentación, secuencia de reacciones que hoy se conoce como *ruta de Embden-Meyerhof*. En 1922, MEYERHOF fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología o Medicina, que compartió con el fisiólogo y bioquímico británico A. HILL. HILL demostró que el oxígeno no se consumía durante la contracción muscular, sino después de ella, lo que indicaba que se requería sólo para la recuperación del músculo. La significación metabólica de los intermediarios fosforilados no fue aclarada hasta los años 30, una vez que el bioquímico alemán LOHMANN aislara de extratos musculares el ATP y la fosfocreatina en 1929.

En 1937, el bioquímico norteamericano de origen alemán LIPMANN intuyó que el requerimiento en fosfato para la demolición metabólica de la glucosa por las células se debía a que este compuesto inorgánico es esencial para el *acoplamiento energético* que conduce a la síntesis del coenzima ATP, descubierto por LOHMANN. En los años siguientes (1939-1941), LIPMANN postuló el papel crucial del ATP en el ciclo de la transferencia de energía por los sistemas bioquímicos. Otro gran bioquímico alemán, WARBURG —descubridor en 1912 de la citocromo oxidasa, el enzima terminal de la respiración— demostró en 1937-38 que la formación de ATP en la glicolisis está catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. WARBURG recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1931, aunque fue también nominado en 1926 y 1944.

LIPMANN compartió en 1953 el premio Nobel de Fisiología o Medicina con otro insigne bioquímico, el también judío-alemán, nacionalizado británico, Hans KREBS, que en 1937 descubrió el ciclo de los ácidos tricarbónicos, por el que el «acetato activo», precedente del catabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, es finalmente demolido anaeróbicamente a dióxido de carbono y poder reductor. Los ciclos oxidativos y reductivos de las pentosas-fosfatos de la disimilación de la glucosa y asimilación del dióxido de carbono fueron establecidos en la década de los 50 por los bioquímicos americanos HORECKER y RACKER, y CALVIN, respectivamente.

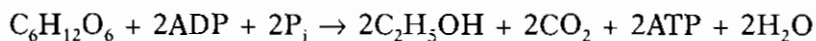
Función del oxígeno en la fermentación: fosforilación a nivel de sustrato

Uno de los grandes descubrimientos de la bioenergética fue, de hecho, la elucidación por WARBURG de que la formación de ATP está acoplada a la deshidrogenación enzimática del gliceraldehído-3-fosfato. Se trataba de la primera demostración de un mecanismo bioquímico —confirmado y desentrañado más tarde por el gran bioenergetista austro-americano RACKER, compañero y amigo de OCHOA— por el cual la energía que suministra la oxidación (deshidrogenación) de un sustrato orgánico por un coenzima se puede conservar en la molécula del ATP resultante de la unión por deshidratación de una molécula de ADP y otra de fosfato inorgánico (P_i) durante el proceso de la *fosforilación a nivel de sustrato*:

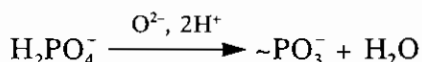


Previamente, WARBURG y Von EULER-CHELPIN habían aislado y establecido la estructura y el mecanismo de acción de los coenzimas deshidrogenantes conocidos al principio como piridín nucleótidos y actualmente como nicotinamida adenín dinucleótidos, que transfieren iones hidruro ($:H$).

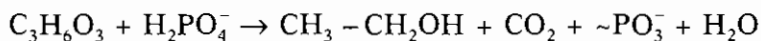
Respecto al *mecanismo de la fosforilación a nivel de sustrato* es importante subrayar un aspecto que ha pasado desapercibido hasta hace poco a los bioenergetistas: la fosforilación es intrínsecamente un proceso ácido-base muy peculiar, promovido en último término por reacciones redox, que implica esencialmente la *transferencia endergónica de un anión óxido del ortofosfato*. Corrientemente se suele constatar de manera superficial que la fermentación alcohólica es un proceso redox intramolecular anaeróbico en el que la energía liberada en la dismutación del azúcar en alcohol y CO_2 se utiliza para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , es decir, para la deshidratación entre el ortofosfato y el ADP para dar ATP:



Paradójicamente, sin embargo, la molécula H_2O no resulta de la unión directa del ADP con el ortofosfato, sino del acoplamiento químico de la óxido-reducción del azúcar con la deshidratación del ortofosfato (H_2PO_4^-) a metafosfato ($\sim\text{PO}_3^-$) por transferencia de su anión óxido (O^{2-}) y disociación de sus dos protones (2H^+):



Es ciertamente sorprendente y digno de reflexión que el anión óxido removido del ortofosfato y transferido al grupo aldehído oxidado del azúcar (simplificado como triosa) aparezca como uno de los átomos de oxígeno del CO_2 que se libera en la fermentación, mientras que los dos protones disociados al medio por el ortofosfato se incorporan finalmente al grupo alcohólico ($-\text{CH}_2\text{OH}$) del etanol:



Simplificadamente, los pasos enzimáticos fundamentales de la glicolisis que resultan finalmente en la transformación del azúcar en alcohol y CO_2 y en la energetización del ortofosfato a metafosfato pueden resumirse como sigue: La deshidrogenación del grupo aldehído del azúcar por pérdida de un ion hidruro (H^-) se acopla con la remoción por el grupo aldehído oxidado (ácido de LEWIS) de un anión óxido (O^{2-}) del ortofosfato (H_2PO_4^-), que se energetiza a metafosfato ($\sim\text{PO}_3^-$) y disocia sus dos protones (2H^+) al medio. El grupo aldehído oxidado que acepta el anión óxido se desenergetiza, a su vez, por resonancia a anión carboxilato ($\text{R}-\text{COO}^-$). Los dos protones son finalmente fijados por el carbanión aldehídico ($\text{CH}_3-\text{C}^-\text{=O}$) resultante de la descarboxilación del piruvato ($\text{CH}_3-\text{CO}-\text{COO}^-$) y por el anión alcoholato ($\text{CH}_3-\text{CH}_2\text{O}^-$) que resulta de la hidrogenación del acetaldehído (CH_3-CHO) por el ion hidruro; ambos intermediarios metabólicos se comportan pues como bases de LEWIS. La molécula de agua se libera, a lo largo de la ruta metabólica, en el paso que cataliza la enolasa.

Especial atención merece el sistema bioquímico de la ruta glicolítica que permite la transducción de la energía redox en energía de fos-

fato. En efecto, la deshidrogenación de un aldehído a anión carboxilato por el NAD(P)^+ , que se reduce a NAD(P)H , implica aparentemente una caída de dos electrones desde el potencial del par reductor R-CHO/R-COO^- (-0,54 V) al potencial del par oxidante NAD(P)H/NAD(P)^+ (-0,32 V), es decir, una liberación de energía de $-2e \times 0,22 \text{ V} = -0,44 \text{ eV}$. Esta pérdida de energía libre permite la energetización de una molécula de ortofosfato a metafosfato (+0,33 eV). El mecanismo de la transducción pone de manifiesto, sin embargo, que el par redox que transfiere el ion hidruro (H^-) al NAD(P)^+ no es el par R-CHO/R-COO^- sino el par $\text{R-CHO/[R-C}^+=\text{O}]$, cuyo potencial es casi idéntico (-0,29 V) al del par NAD(P)H/NAD(P)^+ . Es decir, el sistema redox transductor exhibe dos potenciales, dependiendo de que la forma oxidada del par esté energetizada como *catión acilio* (alto potencial redox) o desenergetizada como *anión carboxilato* (bajo potencial redox). La transferencia electrónica del ion hidruro es, de hecho, isopotencial y conduce a una forma oxidada ácida energetizada transitoria $[\text{R-C}^+=\text{O}]$ respecto a la forma oxidada básica desenergetizada final (R-COO^-):



La clave de la transducción energética es pues precisamente el catión acilio, o forma ácida del par $[\text{R-C}^+=\text{O}]/\text{R-COO}^-$. El catión acilio transfiere finalmente su energía al ortofosfato (H_2PO_4^-), que se energetiza a metafosfato ($\sim\text{PO}_3^-$) y disocia sus dos protones (2H^+), a la par que él se desenergetiza a la forma básica anión carboxilato (R-COO^-) al aceptar el anión óxido (O^{2-}) del ortofosfato. El par $[\text{R-C}^+=\text{O}]$, $\text{H}_2\text{O/R-COO}^-$, 2H^+ y el par $\sim\text{PO}_3^-$, $\text{H}_2\text{O/H}_2\text{PO}_4^-$ son efectivamente los pares ácido-base claves del acoplamiento energético en la fosforilación: el catión acilio puede energetizar el ortofosfato a metafosfato y, viceversa, el metafosfato puede energetizar el anión carboxilato a catión acilio:

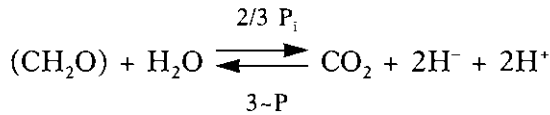


La deshidrogenación de un grupo aldehído a anión carboxilato acoplada a la energetización del ortofosfato (P_i) a metafosfato ($\sim\text{P}$), así como la reacción inversa de hidrogenación de un anión carboxi-

lato a aldehído promovida por la energía del metafosfato, que se desenergetiza a ortofosfato conforme a las ecuaciones:

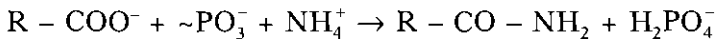


son también, como analizaremos en otros apartados, pasos críticos en la energética de la disimilación exergónica de los carbohidratos (glicolisis y ciclo de KREBS) y en la asimilación endergónica del CO_2 (gluconeogénesis y ciclo de CALVIN):



donde el (CH_2O) es fuente de los dos iones hidruros (2H^-), y el agua de los dos protones (2H^+).

Otro ejemplo sencillo y fundamental de acoplamiento energético entre los pares ácido-base $[\text{R}-\text{C}^+=\text{O}]/\text{R}-\text{COO}^-$ y $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\sim\text{PO}_3^-$ es el de la biosíntesis del grupo amida, por ejemplo, en la conversión del glutamato en glutamina:



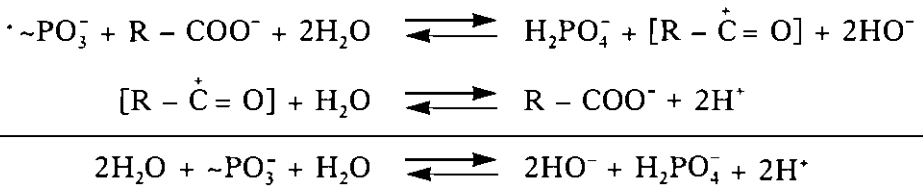
Además de las diversas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas fosforilantes dependientes de NAD(P) , que catalizan las respectivas reacciones reversibles de óxido-reducción del 3-fosfogliceraldehído a 3-fosfoglicerato (glicolisis-gluconeogénesis, ciclos reductivo y oxidativo de las pentosas-fosfato), existe en el citosol de las células eucarióticas fotosintéticas un enzima no fosforilante dependiente de NAD(P) que cataliza la deshidrogenación irreversible en condiciones fisiológicas del 3-fosfogliceraldehído a 3-fosfoglicerato.

La reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato no fosforilante ocurre también a través del catión acilio, pero éste se desener-

getiza espontáneamente a anión carboxilato —igual que en el caso de desacoplamiento por arseniato— fijando el anión óxido de una molécula de agua y disociando al medio sus dos protones a bajo pH:

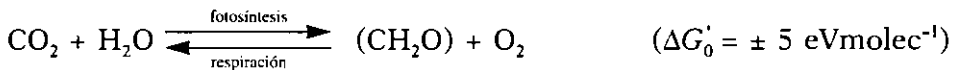


Haciendo uso de un sistema enzimático modelo, constituido fundamentalmente por los dos tipos de *deshidrogenasa fosforilante y no fosforilante*, el grupo de A. SERRANO y M. LOSADA ha demostrado que se puede utilizar la energía de hidrólisis del ATP a través del par catión acilio/anión carboxilato para la disociación secuencial del agua en iones hidrógeno e hidróxido:



Función del oxígeno en la fotosíntesis y respiración

Hay pocas ecuaciones tan simples e importantes en bioenergética como las que definen desde los tiempos de su descubrimiento, hace unos dos siglos, los complejos procesos de la fotosíntesis y la respiración:



Estas ecuaciones simplificadas son, sin embargo, engañosas y causa de graves falacias y enconadas polémicas, así como tema de cuestiones muy importantes y de largo alcance en bioenergética.

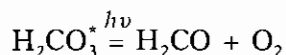
Después de la propuesta inicial de WARBURG de la fotólisis del CO_2 como reacción básica de la fotosíntesis y de la posterior hipótesis de Van NIEL sobre la fotólisis del H_2O , hoy está firmemente establecido después de los trabajos clásicos de ARNON y CALVIN que la

fotosíntesis consiste esencialmente en la fotooxidación del agua, resultante en la generación de poder reductor y enlaces de pirofosfato ricos en energía, y en la subsecuente asimilación endergónica del CO_2 a (CH_2O).

WARBURG, discípulo del gran bioquímico Emil FISCHER, aprendió las técnicas de fotoquímica en el Instituto fundado por Von HELMHOLTZ en Berlín. Este Instituto se hizo famoso en 1900 por la medición de la radiación del cuerpo negro, que permitió a Max PLANCK derivar su ecuación espectral y calcular la constante universal h . Su excepcional formación en bioquímica y fisiología celular le permitió, a su vez, a WARBURG abordar por primera vez, en 1923, el requerimiento cuántico de la fotosíntesis. De acuerdo con WARBURG, hacen falta tres o cuatro cuantos de luz para liberar una molécula de oxígeno del dióxido de carbono en la fotosíntesis; según sus propias palabras, «la fotosíntesis es un proceso perfecto en una naturaleza perfecta».

Para WARBURG, la mejor confirmación de la ley de EINSTEIN-STARK (1908-1912), según la cual *cada fotón absorbido en las reacciones fotoquímicas es capaz de excitar una sola molécula*, fue —junto con el análisis espectral del complejo CO-citocromo oxidasa— su descubrimiento en 1950 de la lisis de una molécula de CO_2 activo (CO_2^*) por un fotón de luz. La escisión por un fotón de luz de una molécula de CO_2 activo en una molécula de carbohidrato (CH_2O) y una de oxígeno fue, según su propia confesión, «el descubrimiento más importante de su vida».

La reacción primaria de la fotosíntesis como *fotólisis del CO_2* fue formulada por WARBURG de la siguiente forma: «One light quantum splits «active» CO_2 into oxygen and carbohydrate. If we write «active» CO_2 as H_2CO_3^* and the carbohydrate formed as H_2CO , then the observed reaction is:



The fundamental fact that one light quantum develops one molecule of oxygen —the beginning of the science of photosynthesis— was discovered in 1950 at Dahlem by a manometric method». WARBURG nunca aisló la especie química H_2CO_3^* , aunque se refirió

repetidamente a ella como «the carbonic acid moiety of the photolyte».

En la década de 1930, las incisivas investigaciones del microbiólogo holandés, nacionalizado americano, Van NIEL le llevaron a postular que la *reacción básica de la fotosíntesis* no es la fotólisis del CO_2 sino la *fotólisis del agua*. La molécula de agua, H_2O , se escindiría por acción de un fotón de luz en una mitad oxidada, representada por $|\text{OH}|$ y una mitad reducida, representada por $|\text{H}|$, una reacción también desconocida en química. La mitad oxidada sería reducida por un reductor externo (como, por ejemplo, los compuestos reducidos de azufre) en las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, mientras que en las plantas superiores daría finalmente lugar a oxígeno molecular; por su parte, la mitad reducida sería últimamente utilizada como poder reductor para la asimilación del dióxido de carbono. Aunque, paradójicamente, Van NIEL era especialista en bacterias fotosintéticas anoxigénicas, su propuesta de la reacción de la fotólisis del agua fue, en principio, acertada y constituye uno de los grandes hitos de la bioenergética. La hipótesis de Van NIEL fue confirmada más tarde experimentalmente por otros científicos usando preparaciones de cloroplastos aislados.

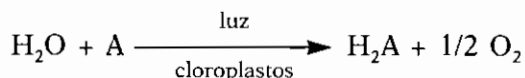
En general, las células eucarióticas presentan en su citosol un número variable, a veces muy elevado, de orgánulos para la realización de sus funciones energéticas. El aislamiento de estas centrales energéticas, bien fotosintéticas (cloroplastos) o bien respiratorias (mitocondrias), supuso de hecho un enorme avance en el estudio de la respiración y de la fotosíntesis a nivel subcelular.

Las *mitocondrias* son la sede del *ciclo de los ácidos tricarbóxicos*, o ciclo de KREBS, para la deshidrogenación anaeróbica de los sustratos orgánicos así como del proceso de la *fosforilación oxidativa*, descubierto por OCHOA, al establecer, durante su estancia en Oxford, el requerimiento de adenín nucleótidos para la oxidación aeróbica del piruvato. Ya en Nueva York, OCHOA atacó de nuevo a comienzos de la década de 1940 el problema de la fosforilación del ADP a ATP por el fosfato inorgánico, estableciendo que la oxidación del piruvato se acopla con la fosforilación de tres moléculas de fosfato por cada átomo de oxígeno (razón P/O = 3). Para entonces estaba ya claro que el coenzima NAD^+ era el primer aceptor de hidrógeno de los sustratos

respiratorios hidrocarbonados y que este poder reductor se transfería después al oxígeno molecular durante la respiración propiamente dicha. Aunque OCHOA no consiguió demostrar el acoplamiento entre la fosforilación y la oxidación del NADH con homogenados celulares, el bioquímico norteamericano LEHNINGER lo consiguió en 1948 con una preparación de mitocondrias aisladas.

En 1954-58, ARNON sorprendió al mundo científico al descubrir que los *cloroplastos* aislados pueden llevar a cabo no sólo la asimilación fotosintética del CO₂ a carbohidrato (*ciclo reductivo de las pentosas-fosfato*, o ciclo de CALVIN), sino la *fosforilación fotosintética*, o fotofosforilación, tanto cíclica como no cíclica.

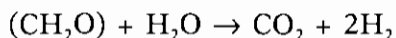
La reacción de fotólisis del agua con fragmentos de cloroplastos fue primeramente conseguida utilizando una variedad de aceptores de hidrógeno (A). En 1937, el bioquímico inglés HILL utilizó un aceptor terminal de electrones no fisiológico y, en 1951, OCHOA y ARNON utilizaron, independientemente, el aceptor fisiológico de iones hidru-ro NADP⁺:



Por otro lado, los bioquímicos norteamericanos RUBEN y KAMEN obtuvieron en 1941, empleando isótopos de carbono y oxígeno, evidencia de que el oxígeno fotosintético procede del agua y no del anhídrido carbónico. En 1946, tras la segunda Guerra Mundial, CALVIN, premio Nobel de Química de 1961, organizó un grupo en Berkeley con objeto de seguir la ruta del carbono en fotosíntesis, utilizando algas unicelulares y aplicando la técnica de cromatografía y autorradiografía. En colaboración con BENSON, aisló el azúcar de cinco carbonos ribulosa-1,5-bisfosfato como aceptor del CO₂ e identificó al fosfoglicerato como primer producto de su fijación. La ruta de la asimilación fotosintética del carbono fue finalmente elucidada por CALVIN y sus colaboradores en la década de 1950.

Como ocurriera con LAVOISIER, el padre de la bioenergética, al interpretar la función del oxígeno como generador de ácidos, varios de los más grandes bioenergetistas de nuestra época cometieron un grave error al interpretar la función del agua (H₂O) como donadora de átomos de hidrógeno en la formación conjunta de poder reductor

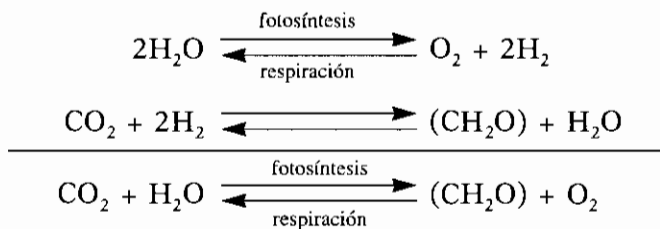
(2H₂) a partir de (CH₂O) en la respiración. En efecto, WALD , premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1967, y LIPMANN escribieron en 1966: «Half the hydrogen burned in respiration comes from water:



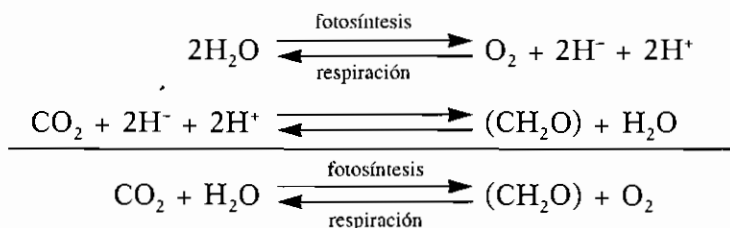
In cellular respiration a molecule of water is added for each carbon in sugar».

Asimismo, RACKER escribió en su magnífico libro *A new look at mechanisms in bioenergetics* (1976): «In both photophosphorylation and oxidative phosphorylation water serves as hydrogen donor», y ROBERTSON especificaría en términos aún más obvios en *The lively membranes* (1983): «The electron-transport system of the respiratory chain takes electrons, previously on substrate molecules or on water, and transfers them to oxygen».

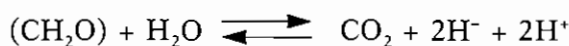
La falacia de estas conclusiones no es patente si se considera que los átomos de hidrógeno procedentes del (CH₂O) y del H₂O son equivalentes por igual en cuanto a su contribución a la formación de poder reductor. Así, mientras que las ecuaciones siguientes demuestran claramente que el oxígeno de la fotosíntesis procede del agua, son equívocas respecto a la cuestión en discusión del origen del poder reductor:



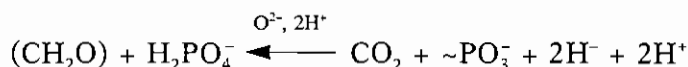
La simple distinción del origen y destino de los iones hidruro (H⁻), que, procedentes de la fotoóxido-reducción del agua (H₂O), reducen al CO₂ durante la fotosíntesis y, viceversa, que, procedentes del (CH₂O), son oxidados por el O₂ durante la respiración, y de los iones hidrógeno (H⁺), que participan en la reacción de reducción del CO₂ removiendo un anión óxido como agua, y viceversa, resuelve definitivamente la confusión que se crea si no se hace esta diferenciación entre iones hidruro e iones hidrógeno:



En primer lugar hay pues que subrayar que el agua (óxido de protones) participa en las reacciones disimilatorias del (CH_2O) con un anión óxido y dos protones, pero no con poder reductor, que procede en su totalidad del carbohidrato como iones hidruro y, viceversa, que los protones participan en las reacciones asimilatorias removiendo un anión óxido del CO_2 como agua y permitiendo su reducción a carbohidrato por los iones hidruro:



En segundo lugar, es importante enfatizar que las reacciones de deshidrogenación de los carbohidratos (glicolisis y ciclo de KREBS) son exergónicas y se acoplan en alto grado con la energetización del ortofosfato a metafosfato, es decir, los iones hidruros del carbohidrato son sustituidos por aniones óxido del ortofosfato (no del agua), que se energetiza a metafosfato y disocia sus dos protones:



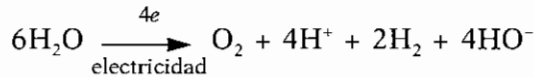
En cambio, las reacciones de reducción del CO_2 a carbohidrato (ciclo de CALVIN) son endergónicas y requieren energía de metafosfato, que se desenergetiza a ortofosfato. De hecho, tanto en los procesos disimilatorios como asimilatorios, son grupos aldehído y aniones carboxilato los que intervienen en los respectivos ciclos.

La formulación en 1959-1961 por ARNON y LOSADA del paralelismo existente entre la electrolisis del agua, por vía química, y la *biofotoelectrolisis del agua*, tal como la realizan las plantas oxigénicas, representó un cambio fundamental respecto al mecanismo de la biofotolisis del agua y un notable avance en el esclarecimiento del proceso fotosintético como flujo no cíclico de electrones contra gradiente.

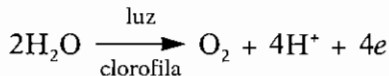
te, promovido por la luz y sensibilizado por el pigmento fotoactivo clorofila, desde el agua (donador último de electrones) a la ferredoxina oxidada o NADP^+ (aceptores últimos de electrones o iones hidruro). ARNON hizo hincapié en muy repetidas ocasiones de que la idea de que los fotones de luz se utilizan para la transferencia de electrones más bien que de átomos masivos supuso un cambio de rumbo decisivo en las teorías imperantes en fotosíntesis antes de los años 60. El concepto de transporte de electrones inducido por la luz es desde entonces uno de los más importantes en fotosíntesis.

El agua es el sustrato primario de la bioenergética, puesto que puede actuar como compuesto anfielectrónico, anfiprótico y anfioxídico, es decir, puede dar y aceptar electrones, protones y aniones óxido en reacciones redox y ácido-base promovidas en último término por la luz y, de este modo, experimentar autoelectrolisis, autoprotolisis y autooxidolisis.

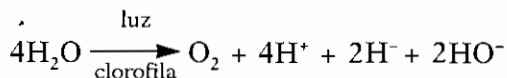
El agua es ciertamente un reductor muy débil (E'_0 , pH 7, +0,82 V), que puede oxidarse a oxígeno molecular a alto potencial, y un oxidante muy débil (E'_0 , pH 7, -0,42 V), que puede reducirse a hidrógeno molecular a bajo potencial. Puesto que el agua es una molécula neutra, aunque muy polarizada (de hecho, óxido de protones), la oxidación de sus aniones óxido por remoción de electrones también libera protones, y la reducción de sus protones por captación de electrones también libera iones hidróxido, lo que determina que sus respectivos potenciales redox aumenten o disminuyan a razón de 60 mV por unidad de pH a la temperatura del laboratorio:



Hoy se acepta universalmente que la fotolisis del agua en fotosíntesis (como la de su electrolisis en una célula electroquímica) sigue una estrategia de rodeo de reacciones fotoquímicas redox y ácido-base catalizadas por la clorofila que resultan globalmente en la liberación de oxígeno molecular y en la formación de poder reductor, o bien electrones que reducen la ferredoxina (E'_0 , pH 7, -0,42 V):



o bien iones hidruro que reducen el NADP^+ (E'_0 , pH 7, -0,32 V):



La fotoelectrolisis y fotoionización del agua es el paso transductor de energía más característico e importante de la fotosíntesis y resulta en la generación de un potencial redox de 1,25 V entre el oxígeno molecular (+0,82 V) y la ferredoxina reducida (-0,42 V) y de un potencial electroquímico de protones de 0,25 V entre el lumen tilacoidal (ácido) y el estroma (básico) (equivalente en principio a una diferencia de unas cuatro unidades de pH). El transporte de cuatro electrones contra el potencial redox de 1,25 V requiere una energía de 5,0 eV, y la translocación de igual número de protones a través de la membrana tilacoidal contra el potencial electroquímico de 0,25 V, una energía de 1,0 eV.

Hasta la década de los 60, y sobre todo por razones históricas y cuantitativas, la fotosíntesis, o función clorofílica, se identificó con la fotoasimilación del anhídrido carbónico por las algas y plantas superiores. Se ignoraba así el hecho fundamental de que las células verdes fabrican, a expensas de la luz solar, no sólo carbohidratos a partir del carbono del CO_2 , sino también las biomoléculas más representativas y abundantes de la materia viva —proteínas y ácidos nucleicos— a partir del carbono y de los demás elementos (hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre) constitutivos de los nutrientes inorgánicos de que se alimentan.

De hecho, la fotosíntesis consiste esencialmente en la conversión endergónica por el reino vegetal, a expensas de la energía radiante del Sol, de los simples sustratos inorgánicos oxidados de que se nutren las plantas (agua, dióxido de carbono, nitrato o dinitrógeno, sulfato y fosfato) en los productos bioquímicos complejos reducidos característicos del material celular (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) que ellas mismas sintetizan y almacenan y en el oxígeno molecular que liberan al medio. Puede estimarse que, gracias al proceso fotosintético, la vegetación de los ecosistemas acuático y terrestre fabrica cada segundo una cantidad de biomasa del orden de 10000 ton, equivalente, en peso seco, a la biomasa de los habitantes de una ciudad como Sevilla o Valencia.

La fotosíntesis es, pues, un proceso típicamente anabólico, promovido por la luz solar visible, en el que diversos sustratos minerales, desprovistos de potencial químico útil, se transforman en una riquísima gama de productos orgánicos vegetales y en oxígeno molecular, ricos, en conjunto, en energía química. La respiración es el proceso biológico exergónico inverso que suministra energía química fisiológica a los organismos heterótrofos y a las propias plantas, cerrando, junto con la combustión, el gigantesco ciclo de materia y energía de la bioenergética.

En la fotosíntesis, los *bioelementos oxidados* se reducen por el poder reductor (ferredoxina reducida e iones hidruro) que suministra el agua. Es decir, el carbono del dióxido de carbono (estado de oxidación, +4) se reduce a carbohidrato (0); el nitrógeno del nitrato (+5) a amoníaco (-3); el azufre del sulfato (+6) a sulfuro (-2), en tanto que el oxígeno del *agua* (-2) se oxida estequiométricamente a *oxígeno molecular* (0), en procesos *redox* que implican cuatro u ocho electrones.

Es muy importante subrayar que, en contraste con estos procesos redox, el fósforo del ortofosfato (H_2PO_4) no cambia su estado de oxidación (+5) durante la fotofosforilación, sino que el *ortofosfato* se energetiza a *metafosfato* ($\sim PO_3$), a expensas de la energía almacenada en los procesos de *ionización del agua* (H_3O^+ y HO^-), en un peculiar *proceso endergónico ácido-base* y se ancla o bien en el P_i formando PP_i o bien en el ADP formando ATP. Parte del metafosfato es a su vez asimilado (ácidos nucleicos, fosfolípidos), pero la mayor parte sirve de lanzadera energética para fines metabólicos endergónicos, concretamente para la reducción y posterior asimilación de los demás bioelementos primordiales y para la polimerización de los sillares moleculares, o unidades monoméricas (azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos), así como para la translocación de iones, procesos durante los cuales el metafosfato se hidrata de nuevo a ortofosfato en *reacciones exergónicas ácido-base*.

Translocación de protones e iones, transferencia del anión óxido y fosforilación a nivel de membrana

En 1961, el bioquímico británico MITCHELL, premio Nobel de Química de 1978, propuso su brillante *teoría quimiosmótica* —hoy ple-

namente confirmada por los espectaculares avances en bioenergética— de que la energía redox de los sistemas fotosintéticos y respiratorios se acopla con la síntesis de ATP a nivel de membrana tilacoidal o mitocondrial a través de un *gradiente electroquímico de protones transmembranal*. La teoría de MITCHELL postula esencialmente que la fosforilación es el resultado de la neutralización del potencial electroquímico ácido-base de protones creado por el transporte de electrones a favor del potencial redox durante la fotosíntesis y la respiración. Los mecanismos de una y otra transducción energética son dos de los grandes retos, todavía pendientes, de la moderna Biología.

Otro de los mecanismos básicos de la bioenergética es el de transducción de la energía de hidrólisis del ATP en la formación de un gradiente de iones, o viceversa. En 1957, el bioquímico danés SKOU, premio Nobel de Química de 1997, descubrió que la hidrólisis del ATP en ADP y P_i por un homogenado de nervios de cangrejo, rico en fragmentos de membranas celulares, requería la presencia simultánea de iones Na^+ y K^+ , además de Mg^{2+} . La actividad ATPásica de las membranas se inhibía por el glucósido digitalíco oubaína, conocido cardiotónico inhibidor del transporte de Na^+ y K^+ a través de las membranas. La mayoría de las células animales contienen una concentración intracelular relativamente alta de K^+ ($> 100 \text{ mM}$) y baja de Na^+ ($< 10 \text{ mM}$), lo que constituye un gradiente significativo con el fluido extracelular, cuya concentración es baja en K^+ ($< 10 \text{ mM}$) y alta en Na^+ ($> 100 \text{ mM}$). Este potencial iónico se mantiene gracias a la actividad de la *ATPasa de Na^+-K^+* , o *bomba de Na^+-K^+* , que transporta iones Na^+ hacia el exterior de la célula e iones K^+ hacia el interior a expensas de la energía de hidrólisis del ATP en ADP y P_i .

La bomba de Na^+-K^+ en algunas células, como las renales o cerebrales, gasta hacia 3/4 partes de todo su ATP en el bombeo de estos iones para mantener el gradiente. El gradiente Na^+-K^+ permite el mantenimiento del potencial de membrana de las células nerviosas o musculares, esencial para la transmisión del impulso nervioso como *potencial de acción*, al producirse un aumento brusco de la permeabilidad a estos iones cuando se estimula o excita la membrana. Por otra parte, el gradiente de Na^+ es la fuerza motriz para el cotransporte (simporte) de la glucosa o de los aminoácidos al interior de las células. Finalmente, la presencia de muchos enzimas intracelulares requiere K^+ , por lo que la concentración de este ion en el interior de las células debe mantenerse alta.

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ está constituida por dos subunidades de aproximadamente 100 y 50 kDa, que probablemente forman un tetrámero ($\alpha_2 \beta_2$) integrado en la membrana. La subunidad α une al ATP y al sodio por el lado citosólico y al K^+ por el lado extracelular. Aunque todavía no se conoce en detalle el mecanismo íntimo de la translocación de los iones, ha sido muy importante el descubrimiento de que el grupo β -carboxilo de un residuo específico de aspartato se fosforila al transferirle el ATP un resto activo de metafosfato. Así como la *fosforilación del enzima* requiere la presencia de Na^+ , la posterior separación del grupo fosfato (¿cómo ortofosfato?) depende de K^+ . Por analogía con los mecanismos bioquímicos de otros sistemas enzimáticos similares, parece lógico concluir que la fosforilación del anión carboxilato del aspartato debe ir seguida de la remoción de un anión óxido y de la transformación del anión carboxilato en su forma energizada, el catión acilio, que podría desempeñar un papel clave en la translocación de los iones. La *bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$* se inhibe por vanadato (VO_4^{3-}), análogo del PO_4^{3-} , y es reversible, es decir, permite la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i cuando se invierte convenientemente el gradiente de Na^+ y K^+ para obligarla a operar en reverso de su función fisiológica normal.

La ATPasa de Ca^{2+} de las membranas del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético es muy similar a la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Su función es bombear el ion Ca^{2+} del citosol (10 μM) al interior del retículo (10 mM) en la fase de relajación del músculo. La excitación de la membrana del retículo sarcoplásmico por un impulso nervioso determina la liberación instantánea del Ca^+ contenido en su interior y desencadena la contracción muscular. El mecanismo de acción de la bomba de Ca^{2+} implica igualmente la fosforilación de un residuo de aspartato del enzima (≈ 100 kDa), que es también reversible y se inhibe por vanadato.

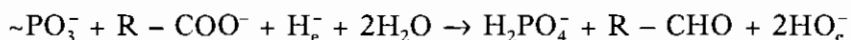
La ATPasa $\text{H}^+\text{-K}^+$ del estómago, cuya función es bombear protones a una enorme diferencia de concentración ($10^6/1$) en intercambio electroneutro con el K^+ , es también similar a las anteriores y, como ellas, pertenece a las ATPasas del tipo P, así designadas por implicar en su acción un intermediario fosforilado.

Las células de plantas y hongos contienen igualmente en su membrana plasmática una *P-ATPasa* que opera como *bomba de protones*

capaz de expulsarlos del citosol al medio externo a costa de la energía de hidrólisis del ATP. Esta bomba primitiva de protones pudo ser el origen de todas las demás P-ATPasas, que evolucionarían en el sentido de transportar otros iones (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}). Al bombear protones (iones con carga positiva) al medio externo y no ser compensadas sus cargas, se crea un potencial de membrana negativo en el recinto citosólico y positivo en el medio externo. A este tipo de bombas se les llama, en consecuencia, *electrogénicas*.

Es interesante mencionar que los movimientos de apertura y cierre de los estomas están controlados por la ATPasa de H^+ . Para que éstos se abran, tiene que aumentar la concentración osmótica en las células estomáticas como consecuencia de la acumulación de K^+ (que entra a favor del potencial eléctrico generado por la ATPasa) y de Cl^- (que entra por cotransporte —simporte— con H^+). Al aumentar la turgencia, se separan las dos células guarda por su zona central y dejan entre ellas un pequeño orificio. En estas circunstancias, se inactiva la bomba de protones, se pierden iones K^+ y Cl^- y se relaja la turgencia, lo que provoca de nuevo el cierre de los estomas.

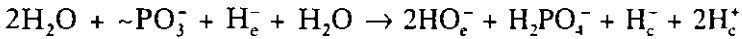
Otro ejemplo de sistema transductor de energía lo constituye la *lanzadera triosa fosfato-fosfoglicerato* entre el estroma del cloroplasto y el citosol, que con el concurso del *sistema de las gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas fosforilante cloroplástica y no fosforilante citosólica* permite que la energía de hidrólisis del ATP pueda utilizarse para el transporte contra gradiente entre ambos compartimentos celulares no sólo de iones hidruro sino también de protones, o más propiamente, de aniones óxido. El metafosfato energetiza en el estroma al anión carboxilato del fosfoglicerato a catión acilio, que se reduce por un ion hidruro (H_2) a fosfogliceraldehído a la par que él se desenergetiza a ortofosfato y fija dos protones del agua, alcalinizando el medio estromático:



Por otro lado, en el citosol, el fosfogliceraldehído se deshidrogena por remoción de un ion hidruro (H_2), y el catión acilio resultante se desenergetiza a anión carboxilato al remover un anión óxido del agua y disociar dos protones a bajo pH, acidificando el medio citosólico:



La lanzadera, al permitir la salida de fosfogliceraldehído y la entrada de fosfoglicerato, determina, como resultado neto de la hidratación del metafosfato a ortofosfato, la salida de iones hidruro y la acidificación del citosol respecto al estroma:

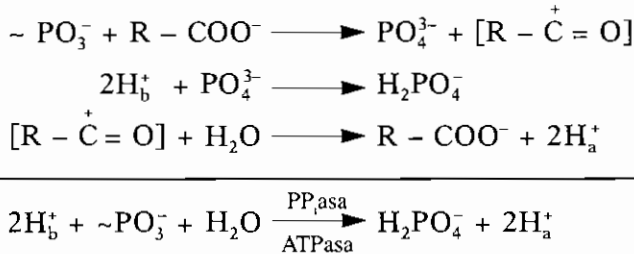


Hasta ahora no se había encontrado explicación al hecho de que exista una diferencia de aproximadamente una unidad de pH entre el citosol y el estroma de los cloroplastos. Aunque el fenómeno se había intentado explicar por la existencia en la membrana del cloroplasto de una bomba electrogénica de protones promovida por ATP o de un antiportador H^+K^+ , ambas propuestas carecen hasta el momento de evidencia experimental.

En principio, y de acuerdo con uno de los requisitos básicos de la teoría de MITCHELL, se aceptaba que las ATP sintasas del tipo $F_o F_1$ (cloroplástica, mitocondrial o bacteriana) no forman intermediarios fosforilados. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que las *ATPasas vacuolares* (V-ATPasas), que son también del tipo $F_o F_1$, sí fosforilan un residuo de aspartato, como lo hacen las típicas P-ATPasas.

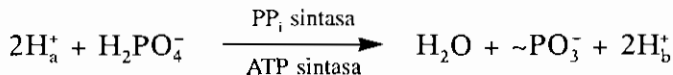
Este hecho, junto a la existencia en la membrana vacuolar de plantas de una pirofosfatasa, PP_i asa, bombeadora de protones de estructura mucho más simple (una única subunidad de aproximadamente 70 kDa), puede obligar a tener que reconsiderar anteriores hipótesis, en el sentido de que todas las *ATPasas* y *PP_i asas membranales* tengan que operar a través de un intermediario fosforilado, lo que significaría que la fosforilación de un grupo carboxilo es requisito indispensable para su funcionamiento hidrolítico. Puesto que la formación de un anión ortofosfato desprotonado, fuertemente básico respecto al agua, y de un catión acilio, fuertemente ácido frente al agua, es inseparable en sus respectivos entornos acuosos de su capacidad de reacción con ésta, el encadenamiento vectorial de los hechos conduciría inevitablemente a la asociación de dos protones por el lado básico de la membrana transductora ($2H_b^+$) y a la disociación de dos protones por el lado ácido ($2H_a^+$), con regeneración del anión carboxilato.

Es decir, el mecanismo de acción de todas las *ATPasas* y *PP_iasas* de protones podría quedar reducido bioquímicamente a la interacción de los pares metafosfato-ortofosfato y catión acilio-anión carboxilato entre sí y con sus respectivos entornos acuosos:



Por otro lado, es muy importante destacar que las bacterias fotosintéticas anoxigénicas poseen una *PP_i sintasa* membranal relativamente simple en su estructura frente a la *ATP sintasa* y similar a la *PP_i asa* vacuolar. Si se tiene en cuenta que la síntesis química y enzimática del pirofosfato a partir del ortofosfato es relativamente simple, se puede estar muy cerca de aclarar el mecanismo bioquímico de la formación del metafosfato a nivel de membrana.

Los complicados cambios conformacionales que parecen operar en las complejas *F_oF₁ ATP sintasas* multiméricas podrían estar reducidos al mínimo en la *PP_i sintasa*, y el abordaje bioquímico y molecular ser, por tanto, mucho más asequible en este enzima primigenio. El mecanismo bioquímico de la fosforilación a nivel de membrana por la *PP_i sintasa* y la *ATP sintasa* podría también ocurrir, con carácter vectorial, a través del par (R-C⁺=O)/R-COO⁻ de acuerdo con la siguiente ecuación global, inversa a la anteriormente escrita para las *PP_iasas*, *P-ATPasas* y *V-ATPasa*:



Oxígeno y evolución del metabolismo energético en la biosfera

La *fermentación*, la *fotosíntesis* y la *respiración* son procesos de conversión de energía en los que la *energía química* de los nutrientes o la

energía radiante del Sol se transduce secuencialmente en *energía re-dox*, *energía ácido-base* y, finalmente, *energía metafosfato-ortofosfato*. La fermentación es un proceso catalítico primario anaeróbico de conversión de energía, mientras que la fotosíntesis y la respiración son procesos evolutivamente más tardíos, que implican, respectivamente, la oxidación endergónica del agua a oxígeno molecular, a expensas de la energía de la luz solar, por los bioelementos primordiales oxidados—carbono, nitrógeno y azufre— y la reducción exergónica de dioxígeno a agua por los correspondientes bioelementos reducidos; los tres procesos se acoplan a la energetización del ortofosfato, que pasa a metafosfato ($\sim P$) y se ancla o bien en el propio ortofosfato (P_i) para dar pirofosfato inorgánico ($P_i \sim P$), o bien en el ADP para dar ATP ($ADP \sim P$). El papel del oxígeno reducido o anión óxido, parece ser crucial en la transducción de energía durante el proceso ácido-base de deshidratación por remoción de un anión óxido y dos protones del ortofosfato ($H_2PO_4^-$) a metafosfato ($\sim PO_3^-$), tanto en la fosforilación a nivel de sustrato como de membrana.

De acuerdo con la teoría de DARWIN, OPARIN, HALDANE, MILLER, etc., la vida en la Tierra surgió en los océanos durante un periodo en que la atmósfera terrestre era reductora y contenía unas cuantas *moléculas primigenias*, H_2 , H_2O , NH_3 , CH_4 , CO , CO_2 , pero no O_2 . Los compuestos orgánicos se debieron sintetizar abióticamente a partir de estos *compuestos inorgánicos simples* por acción del calor, de la descarga eléctrica y de la luz solar ultravioleta, que al no existir capa de ozono podría llegar a la superficie terrestre y penetrar hasta las capas superiores del océano. En ausencia de oxígeno libre, estos *compuestos orgánicos primordiales* serían estables y se acumularían y polimerizarían, dando lugar a una «sopa» caliente, cada vez más concentrada. Los primeros organismos vivos serían poco más que un conjunto de compuestos químicos (*metabolitos* y *macromoléculas*) envueltos en una *membrana celular* que los protegería contra la destrucción y dilución.

Estos *protoorganismos* serían capaces de crecer y dividirse a expensas de la *energía* que obtenían por *fermentación* de las sustancias en su entorno. Cuando los alimentos naturales empezaron a escasear, aparecería la *fotosíntesis* como fuente alternativa de energía, primero anoxigénica y eventualmente oxigénica. El oxígeno liberado en la fotosíntesis determinaría el tránsito de la atmósfera reductora a una oxidante, y este

elemento, aparte de ser esencial para la *respiración*, tendría un efecto colateral de largo alcance al dar lugar a la formación de un *manto de ozono* en las altas capas de la atmósfera por la acción de la radiación ultravioleta, permitiendo con ello la emergencia de los organismos de las aguas oceánicas y la invasión biológica de las áreas continentales. La presencia de oxígeno molecular conduciría a la *evolución del metabolismo energético* de tipo fermentativo al de tipo fotosintético y, finalmente, al de tipo respiratorio, propio de los organismos aeróbicos.

La Bioquímica comparada ha suministrado sólida evidencia a favor de la hipótesis inicial del insigne biólogo inglés DARWIN. Además, existen pruebas geológicas de la propia historia de la Tierra (atmósfera reductora original y restos fósiles de los microorganismos primitivos) que apoyan firmemente esta teoría. Finalmente, una demostración plausible de su validez es la consecución experimental en el laboratorio de la síntesis abiótica de moléculas biológicas, así como los conocimientos suministrados por la Biología molecular sobre la evolución del potencial genético y proteico de las células.

Es probable que los primeros organismos que aparecieron en la Tierra carecieran de maquinaria respiratoria y fueran *fermentadores anaeróbicos* estructuralmente unicelulares del tipo de los *Clostridia*, las bacterias productoras del botulismo y de la gangrena en las heridas. Estos microorganismos poseen como única ruta metabólica productora de energía la *glicolisis*, un mecanismo catabólico universal acoplado a la síntesis de ATP. Otro tipo de microorganismos anaeróbicos muy interesantes —tal vez fósiles vivientes de épocas muy remotas en que la atmósfera del planeta era todavía reductora— son los *Desulfovibria*, las bacterias de las aguas residuales que respiran reduciendo el sulfato a ácido sulfhídrico y que contribuyen así al hedor de las cloacas. También aparecerían las *bacterias fotosintéticas anoxigénicas*, organismos fotoquimioergónicos que utilizan la luz, juntamente con compuestos químicos reducidos, como fuente de energía. Estos microorganismos, al no poder utilizar todavía el agua para la generación de poder reductor, precisan compuestos reducidos —hidrógeno molecular, sulfuro de hidrógeno o compuestos orgánicos— para este propósito. Las bacterias fotosintéticas son, pues, organismos intermedios entre las bacterias anaeróbicas y las cianobacterias, o algas verde-azuladas.

Con la aparición de las *cianobacterias*, organismos completamente fotoergónicos, que utilizan la luz como fuente exclusiva de energía,

pero que son además capaces de utilizar el agua como fuente de poder reductor, entra en escena la *fotosíntesis oxigénica*, uno de los pasos más decisivos en la historia de la evolución biológica. La aparición de este tipo de fotosíntesis dio como resultado la formación de oxígeno molecular en la atmósfera.

La conclusión más relevante que puede sacarse al comparar el metabolismo, tanto energético como plástico, de los seres vivos es que todos presentan un *metabolismo fermentativo común* y un *código genético universal*, lo que sugiere un mismo origen en la cadena evolutiva. Una segunda conclusión importante es que la vida debió surgir en una época en que el oxígeno no había hecho aún su aparición en la atmósfera, lo que equivale a decir que la atmósfera primitiva fue reductora, y no oxidante como la actual. El carácter reducido de los antiguos sedimentos minerales sugiere también que su depósito debió tener lugar antes de la aparición de la *fotosíntesis*, cuando la atmósfera era todavía reductora. El oxígeno tiende a oxidar todas las sustancias químicas reducidas, tanto inorgánicas como orgánicas. La aparición de oxígeno libre hizo posible la puesta en marcha de la *respiración aeróbica*, el tipo más eficiente de catabolismo energético.

La vida se hubiera quedado, en efecto, en un esbozo muy primitivo de no haber sido por la aparición de oxígeno en nuestra atmósfera, gracias al proceso de la fotosíntesis del tipo que realizan las algas y las plantas superiores. En la *vida sin oxígeno molecular*, el papel de este elemento en el metabolismo energético hubiera quedado esencialmente limitado al que desempeña en los procesos puramente anaeróbicos (glicolisis, gluconeogénesis, ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato, ciclo de CALVIN, ciclo de KREBS, biosíntesis de lípidos, proteínas, etc.). En estos procesos anaeróbicos, *el oxígeno reducido actúa como anión óxido en las reacciones ácido-base implicadas en la fosforilación*, concretamente, en la transformación endergónica de un anión carboxilato ($R-COO^-$) en catión acilio ($R-C^+=O$) y, viceversa, en la conversión exergónica de un catión acilio en anión carboxilato.

La composición elemental del Universo, con una predominancia abrumadora de hidrógeno, apoya la idea de una *atmósfera original reductora*. Las atmósferas de los planetas mayores que la Tierra, con campos gravitatorios superiores que previenen la pérdida de sus atmósferas primitivas, se componen fundamentalmente de H_2 , He, H_2O ,

CH_4 , CO , CO_2 , N_2 y NH_3 , sin oxígeno libre. Los elementos químicos se generan en las estrellas a partir de protones, neutrones y electrones, siendo el hidrógeno y el helio los que se formaron en primer lugar y también los más abundantes en el Universo (93% y 7%, respectivamente, del número total de átomos, o sea, 75% y 25% en porcentaje en masa).

La Geoquímica se ocupa del estudio y la distribución temporal y espacial de los elementos químicos en las diversas partes de la Tierra. Puesto que, a causa de su ligereza, tanto el hidrógeno como el helio se difunden en sus formas elementales alejándose de la superficie de la Tierra, estos gases sólo se encuentran en las capas superiores de la atmósfera. Por otro lado, como el helio es un gas noble que no forma compuestos, aparece muy escaso en la superficie terrestre y sólo se encuentra en cantidades muy pequeñas en la atmósfera y en el petróleo y gas natural. En cambio, como el hidrógeno es muy reactivo, se encuentra combinado en numerosos compuestos y es relativamente abundante en la corteza terrestre, en la que ocupa el tercer lugar en porcentaje en átomos ($\approx 15\%$), después del oxígeno ($\approx 55\%$) y silicio ($\approx 16\%$), y el noveno lugar en porcentaje en masa ($\approx 1\%$).

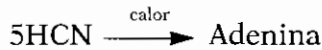
Una tercera parte de los elementos, aproximadamente, se presenta en la Tierra en estado libre. Este grupo de elementos incluye el nitrógeno y el oxígeno. En tanto el nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, el oxígeno es el que más abunda en la corteza terrestre considerada en su conjunto. Por ser muy reactivo, el oxígeno forma gran cantidad de compuestos, y es el principal componente del agua y uno de los principales constituyentes de los minerales y las rocas.

La Tierra en conjunto se compone fundamentalmente de silicatos, rodeando un núcleo de hierro-níquel. El oxígeno de los silicatos está encerrado en la propia red mineral y es de hecho oxígeno reducido (O^{2-}), que no puede ejercer la acción oxidante del oxígeno libre (O_2). Los minerales de hierro sirven como indicadores del estado de oxidación de su entorno. Los colores familiares naranja y rojo de las sales férricas de las arenas se manifiestan sólo en la superficie. Un poco por debajo de ella, esos colores se tornan verdes y negruzcos, como corresponde a los compuestos ferrosos. Los minerales oxidados constituyen pues sólo la costra expuesta a la atmósfera de oxígeno libre.

La vida ha «oxidado» la superficie de nuestro planeta, pero ha ejercido poco efecto en su interior.

Los elementos más abundantes en porcentaje en masa de la corteza terrestre son el oxígeno ($\approx 50\%$) y el silicio ($\approx 25\%$). El aluminio, hierro, calcio, sodio, potasio, magnesio e hidrógeno constituyen casi el 25% restante. Es decir, nueve elementos constituyen casi el 99% de la masa de la corteza terrestre. Los bioelementos primordiales fósforo (0,12%), carbono (0,08%), azufre (0,06%), y nitrógeno (0,03%) ocupan los puestos número doce, catorce, quince y diecisiete. El cloro (0,2%) ocupa el undécimo lugar, delante del fósforo.

Por la relevancia de la adenina como componente de la moneda energética universal en biología, el polifacético ATP, y de los *ácidos nucleicos* merece destacarse que la síntesis abiótica de esta aparentemente complicada base púrica, un pentámero de cianuro de hidrógeno —«inocente precursor» prebiótico de biomoléculas—, se logra sencillamente calentando a 90 °C durante varios días una solución de este potente reactivo químico y fulminante y mortífero veneno:



El ATP ha sido de hecho sintetizado por irradiación a partir de adenina, ribosa y fosfato por el indio-estadounidense PONNAMPERUMA, autor del libro *The origins of life* (1972). Debe también recordarse que el pirofosfato y los polifosfatos en general contienen enlaces ricos en energía (es decir, grupos metafosfato), por lo que seguramente pudieron desempeñar un papel primordial en los orígenes de la vida. El gran bioenergetista LIPMANN hizo notar en *The origins of prebiological systems* (1965): «On the phosphate side, it may be reasonable to assume that generation of the phosphate group potential might have originated with inorganic pyrophosphate as the primitive group carrier».

La clorofila

Como farmacéutico que ha consagrado su vida a investigar la función de la luz y del oxígeno en bioenergética, ha sido para mí una in-

mensa satisfacción poder referirme, con toda la justicia que los hechos y la historia demandan, a reivindicar, en esta solemne sesión que hoy celebra la Real Academia de Farmacia para aceptarme como uno de sus miembros, los relevantes descubrimientos que realizaron cuatro sobresalientes precursores de nuestra profesión, REY, SCHEELE, BAYEN y RITTER sobre uno de los primeros "aires" identificados en los albores de la Química.

Para terminar, quisiera dedicar mis últimas consideraciones a la clorofila, el maravilloso pigmento descubierto por los insignes farmacéuticos PELLETIER y CAVENTOU, padres asimismo de los alcaloides. PELLETIER y CAVENTOU creyeron, sin embargo, que estos compuestos no contenían nitrógeno, otro de los "aires" identificados al principio de la Química. El nitrógeno resultó ser también uno de los bioelementos primordiales, a cuya asimilación por las algas y plantas ha dedicado nuestro Instituto especial atención.

La trascendencia de la función de la clorofila como sistema transductor de energía luminosa en energía redox no admite parangón en la energética del mundo vivo. La gran contribución de la clorofila a la bioenergética consistió en la introducción en el metabolismo celular, hace unos 3500 millones de años, de los *fotosistemas transductores redox de un electrón*, obviamente los sistemas transductores de energía luminosa en energía química más importantes y universales de la biología.

En solución, la molécula de clorofila excitada electrónicamente por la absorción de un fotón pierde su energía como fluorescencia roja al desexcitarse y volver a su estado fundamental. En cambio, en las membranas fotosintéticas forma parte de un centro de reacción que promueve en picosegundos la transferencia del electrón excitado a un aceptor, quedando la propia molécula de clorofila en estado oxidado y en condiciones de aceptar un nuevo electrón de un donador.

Según la teoría unificada de transducción de energía propuesta por nuestro grupo, la *energía electrónica* (resultante o bien, como en el caso de la clorofila, de la fotoexcitación de electrones por paso de un orbital a otro de mayor energía, o bien, como en el caso de los aniones carboxilato, de la localización de electrones dentro de un orbital molecular π , al reducirse los límites de éste— parece ser el eslabón obligatorio entre las diferentes formas de energía transducibles por los sistemas bioquímicos tratados en este discurso.

La energetización electrónica de una sustancia equivale a un aumento de su concentración, a razón de diez veces por cada 60 meV a la temperatura ambiente. Si, como en el caso de la clorofila, se energetiza la forma reducida del par por la absorción de un fotón de luz visible (≈ 2 eV), el potencial se hace más negativo en el correspondiente valor, lo que resulta equivalente a un enorme cambio de concentración. Los fotosistemas redox de clorofila se caracterizan, por tanto, funcionalmente por ser capaces de operar a *dos potenciales redox alternantes*: el par de alto potencial, cuya forma reducida está desenergetizada, y el par de bajo potencial, cuya forma reducida está excitada electrónicamente, compartiendo ambos pares la misma forma oxidada.

Operando conforme a este principio, los fotocentros de los fotosistemas II y I promueven, a expensas de la energía de la luz solar, la transferencia de electrones de baja energía, procedentes de donadores de electrones de alto potencial redox (en último término, del agua, que se oxida a oxígeno molecular), a aceptores de electrones de bajo potencial redox (en último término, a los bioelementos primordiales oxidados), que reciben electrones de alta energía y se reducen concomitantemente en el proceso. De esta manera la luz promueve, a través de la clorofila, la subida de electrones contra la diferencia de potencial de 1,25 V que existe entre los electrodos de oxígeno e hidrógeno.

Agradecimientos

El color y el calor de esta solemne y entrañable ceremonia me hacen sentir a flor de piel y en lo más íntimo de mi ser una profunda emoción y un agradecimiento sin límites que quisiera saber expresar y hacer llegar muy directamente a todos y cada uno de mis queridos amigos Académicos y, en especial, a nuestro Presidente por su cordial y lúcida presentación, para corresponder así a vuestra generosidad y benevolencia. A Julio Rodríguez Villanueva me une más de medio siglo de sólida, leal y fraternal amistad, cimentada en mutua admiración y ferviente comunidad de afectos e ideales. Nuestras vidas han sido paralelas hasta extremos insospechados, y cuando hubimos de separarnos físicamente en la distancia, nuestros corazones se sintie-

ron más unidos y cercanos. Ambos hemos tenido la suerte de que Dios haya premiado graciosamente nuestras vidas uniéndonos a mujeres y madres ejemplares, Isabel y Antonia, también amigas del alma, sin cuyo cariño y ayuda en casa y en el trabajo ninguno de los dos hubiera podido ni logrado nada.

PUBLICACIONES DEL PROF. MANUEL LOSADA VILLASANTE

a) Trabajos de Investigación (Revistas)

- 1a. DIE PLASTIDEN IN DEN ALBICATEM GEWEBEN DER BLÄTTER EINER MEDIOVARIEGATEN FORM VON *Chlorophytum comosum*
S. Strugger und M. Losada
Protoplasma 45:540-551 (1956)
- 2a. DIE ZELLORGANELLE DER WURZELHAARE VON *Trianea bogotensis*
E.S. Perner und M. Losada
Protoplasma 46:579-584 (1956)
- 3a. THE HYDROLYSIS OF RAFFINOSE BY YEAST MELIBIASE AND THE FERMENTATION OF RAFFINOSE BY COMPLEMENTARY GENE ACTION
M. Losada
Compt. Rend. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol. 25:460-482 (1957)
- 4a. ESTUDIO CITOLOGICO DE LA EPIDERMIS DEL BULBO DE UNA VARIEDAD HEXAPLOIDE DE *Scilla maritima L.*
M. Losada y G. Giménez
An. Edaf. Fisiol. Veg. XVI:885-901 (1957)
- 5a. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: X. DEPENDENCE OF CARBON DIOXIDE ASSIMILATION ON THE PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF CHLOROPLASTS
A.V. Trebst, M. Losada and D.I. Arnon
J. Biol. Chem. 234:3055-3058 (1959)

- 6a. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: XI. CO₂ ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM
M. Losada, A. Trebst and D.I. Arnon
J. Biol. Chem. 235:832-839 (1960)
- 7a. PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS: XII. INHIBITORS OF CO₂ ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM
A.V. Trebst, M. Losada and D.I. Arnon
J. Biol. Chem. 235:840-844 (1960)
- 8a. EQUIVALENCE OF LIGHT AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS
M. Losada, A.V. Trebst, S. Ogata and D.I. Arnon
Nature 186:753-760 (1960)
- 9a. PHOTOFIXATION ON NITROGEN AND PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY THIOSULFATE DURING BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS
D.I. Arnon, M. Losada, M. Nozaki and K. Tagawa
Biochem. J. 77:23 P (1960)
- 10a. PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN, PHOTOFIXATION OF NITROGEN AND A UNIFIED CONCEPT OF PHOTOSYNTHESIS
D.I. Arnon, M. Losada, M. Nozaki and K. Tagawa
Nature 190:601-604 (1961)
- 11a. SEPARATION OF TWO LIGHT REACTIONS IN NONCYCLIC PHOTOPHOSPHORYLATION OF GREEN PLANTS
M. Losada, F.R. Whatley and D.I. Arnon
Nature 190:605-610 (1961)
- 12a. PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION AND MOLECULAR OXYGEN
D.I. Arnon, M. Losada, F.R. Whatley, H.Y. Tsujimoto, D.O. Hall and A. Horton
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47:1314-1334 (1961)

- 13a. NITRITE REDUCTION BY ISOLATED CHLOROPLASTS IN LIGHT
A. Panequé, F.F. del Campo and M. Losada
Nature 198:90-91 (1963)
- 14a. MECHANISM OF NITRITE REDUCTION IN CHLOROPLASTS
M. Losada, A. Paneque, J.M. Ramírez and F.F. del Campo
Biochem. Biophys. Res Commun. 10:298-303 (1963)
- 15a. NITRATE REDUCTION IN THE LIGHT BY ISOLATED CHLOROPLASTS
F.F. del Campo, A. Paneque, J.M. Ramírez and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 66:450-452 (1963)
- 16a. THE GLYOXYLATE CYCLE IN OLIVE SEEDLINGS
J.L. Cánovas, M. Ruíz-Amil and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 73:646-649 (1963)
- 17a. CICLO DEL ACIDO GLIOXILICO EN UNA BACTERIA DENITRIFICANTE CRECIDA AEROBICAMENTE CON NITRATO
M. Ruíz-Amil, J.L. Cánovas y M. Losada
Microbiol. Españ. 16:231-248 (1963)
- 18a. MECHANISM OF NITRATE REDUCTION IN CHLOROPLASTS
J.M. Ramírez, F.F. del Campo, A. Paneque and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15:297-302 (1964)
- 19a. OXALACETATE, CITRAMALATE AND GLUTAMATE FORMATION FROM PYRUVATE IN BAKER'S YEAST
M. Losada, J.L. Cánovas and M. Ruiz-Amil
Biochem. Z. 340:60-74 (1964)
- 20a. LIGHT AND DARK REDUCTION OF NITRITE IN A RECONSTITUTED ENZYMIC SYSTEM
A. Paneque, J.M. Ramírez, F.F. del Campo and M. Losada
J. Biol. Chem. 239:1737-1741 (1964)

- 21a. CONDENSATION OF (-KETOBUTYRATE AND ACETIL-CoA IN BAKER'S YEAST
J.L. Cánovas, M. Ruiz-Amil and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 50:164-170 (1965)
- 22a. NITRATE REDUCTION WITH MOLECULAR HYDROGEN IN A RECONSTITUTED ENZYMATIC SYSTEM
F.F. del Campo, A. Paneque, J.M. Ramírez and M. Losada
Nature 205:387-388 (1965)
- 23a. FLAVIN NUCLEOTIDE NITRATE REDUCTASE FROM SPINACH
A. Paneque, F.F. del Campo, J.M. Ramírez and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 109:79-85 (1965)
- 24a. LIGHT AND DARK REDUCTION OF NITRATE IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM
M. Losada, J.M. Ramírez, A. Paneque and F.F. del Campo
Biochim. Biophys. Acta 109:86-96 (1965)
- 25a. PROPERTIES AND FUNCTION OF YEAST PYRUVATE CARBOXYLASE
M. Ruiz-Amil, G. de Torrónategui, E. Palacián, L. Catalina and M. Losada
J. Biol. Chem. 240:3485-3492 (1965)
- 26a. FERREDOXIN-NITRITE REDUCTASE FROM SPINACH
J.M. Ramírez, F.F. del Campo, A. Paneque and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 118:58-71 (1966)
- 27a. PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE IN GLUCONEOGENESIS AND ITS REPRESSION BY HEXOSES IN YEASTS
G. de Torrónategui, E. Palacián and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22:227-231 (1966)
- 28a. FERREDOXIN AND THE DARK AND LIGHT REDUCTION OF DINITROPHENOL
F.F. del Campo, J.M. Ramírez, A. Paneque and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22:547-553 (1966)

- 29a. LIGHT REDUCTION OF NITRATE BY CHLOROPLASTS DEPENDENT ON FERREDOXIN AND NAD^+
M. Losad  and A. Paneque
Biochim. Biophys. Acta 126:578-580 (1966)
- 30a. COMPARATIVE REDUCTION OF NITRATE BY SPINACH NITRATE REDUCTASE WITH NADPH_2
A. Paneque and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 128:202-204 (1966)
- 31a. INHIBITION OF YEAST PYRUVATE CARBOXYLASE BY L-ASPARTATE AND OXALACETATE
E. Palacián, G. de Torr ntegui and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24:644-649 (1966)
- 32a. CELLULAR DISTRIBUTION OF YEAST PYRUVATE DECARBOXYLASE AND ITS INDUCTION BY GLUCOSE
M. Ruiz-Amil, M.J. Fernández, L. Medrano and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 55:46-53 (1966)
- 33a. REGULATION AND FUNCTION OF PYRUVATE KINASE AND MALATE ENZYME IN YEAST
M. J. Fernández, L. Medrano, M. Ruiz-Amil and M. Losada
European J. Biochem. 3:11-18 (1967)
- 34a. ENZYMATIC REDUCTION OF NITRATE WITH FLAVIN NUCLEOTIDES REDUCED BY A NEW CHLOROPLAST NADH -SPECIFIC DIAPHORASE
A. Paneque, P.J. Aparicio, L. Catalina and M. Losada
Biochem. Biophys. Acta 162:149-151 (1968)
- 35a. UTILIZATION OF MALATE OR ASPARTATE BY A YEAST LACKING MALATE ENZYME
G. de Torr ntegui, E. Palacián, E.F. Tresguerres and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 62:192-197 (1968)

- 36a. NITRATE AS A HILL REAGENT IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM
A. Paneque, P.J. Aparicio, J. Cárdenas, J.M. Vega and M. Losada
FEBS Lett. 3:57-59 (1969)
- 37a. EFFECT OF GLUCOSE ON PYRUVATE UTILIZATION BY *Rhodotorula glutinis*
L. Medrano, M. Ruiz-Amil and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 66:239-249 (1969)
- 38a. MECHANISM OF NITRATE REDUCTION IN *Chlorella*
W.G. Zumft, A. Paneque, P.J. Aparicio and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36:980-986 (1969)
- 39a. INACTIVATION AND REPRESSION BY AMMONIUM OF THE NITRATE REDUCING SYSTEM IN *Chlorella*
M. Losada, A. Paneque, P.J. Aparicio, J.M. Vega, J. Cárdenas and J. Herrera
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38:1009-1015 (1970)
- 40a. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ROLE OF FAD IN THE NADH-NITRATE REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*
W.G. Zumft, P.J. Aparicio, A. Paneque and M. Losada
FEBS Lett. 9:157-160 (1970)
- 41a. MOLYBDENUM AND IRON AS CONSTITUENTS OF THE ENZYME OF THE NITRATE REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*
P.J. Aparicio, J. Cárdenas, W.G. Zumft, J.M. Vega, H. Herrera, A. Paneque and M. Losada
Phytochem. 10:1487-1495 (1971)
- 42a. ROLE OF MOLYBDENUM IN NITRATE REDUCTION BY *Chlorella*
J.M. Vega, J. Herrera, P.J. Aparicio, A. Paneque and M. Losada
Plant Physiol. 48:294:299 (1971)

- 43a. MOLYBDENUM AND THE NITRATE-REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*
J. Cárdenas, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 79:367-376 (1971)
- 44a. SPECIFIC PROTECTION AGAINST INHIBITORS OF THE NADH-NITRATE REDUCTASE COMPLEX FROM SPINACH
A. M. Relímpio, P.J. Aparicio, A. Paneque and M. Losada
FEBS Lett. 17:226-230 (1971)
- 45a. MECHANISM OF NITRATE AND NITRITE REDUCTION IN *Chlorella* CELLS GROWN IN THE DARK
M.G. Guerrero, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:82-89 (1971)
- 46a. DETERMINATION OF NITRATE WITH NITRATE REDUCTASE FROM SPINACH LEAVES
A.M. Relímpio, M.G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada
Z. Pflanzenphysiol. 66:290-293 (1972)
- 47a. EFFECT OF IRON SUPPLY ON THE ACTIVITIES OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM FROM *Chlorella*
J. Cárdenas, J. Rivas, A. Paneque and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 81:260-263 (1972)
- 48a. ¹⁸⁵W-LABELLED NITRATE REDUCTASE FROM *Chlorella*
A. Paneque, J.M. Vega, J. Cárdenas, J. Herrera, P.J. Aparicio and M. Losada
Plant Cell. Physiol. 13:175-178 (1972)
- 49a. REGULATION BY AMMONIA OF NITRATE REDUCTASE SYNTHESIS AND ACTIVITY IN *Chlamydomonas reinhardtii*
J. Herrera, A. Paneque, J.M. Maldonado, J.L. Barea and M. Losada
Biochim. Biophys. Res Commun. 48:996-1003 (1972)
- 50a. INTERCONVERSION OF THE ACTIVE AND INACTIVE FORMS OF *Chlorella* NITRATE REDUCTASE
C.G. Moreno, P.J. Aparicio, E. Palacián and M. Losada
FEBS Lett. 26:11-14 (1972)

- 51a. MECHANISM OF NITRATE REDUCTASE REVERSIBLE INACTIVATION BY AMMONIA IN *Chlamydomonas*
M. Losada, J. Herrera, J.M. Maldonado and A. Paneque
Plant Sci. Lett. 1:31-37 (1973)
- 52a. CHARACTERIZATION OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM OF THE YEAST *Torulopsis nitratophila*
J. Rivas, M.G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada
Plant Sci. Lett. 1:105-113 (1973)
- 53a. REVERSIBLE INACTIVATION BY NADH AND ADP OF *Chlorella fusca* NITRATE REDUCTASE
J.M. Maldonado, J. Herrera, A. Paneque and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51:27-33 (1973)
- 54a. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A SOLUBLE NITRATE REDUCTASE FROM *Azotobacter chroococcum*
M.G. Guerrero, J.M. Vega, E. Leadbetter and M. Losada
Arch. Mikrobiol. 91:287-304 (1973)
- 55a. REDUCED NICOTINAMIDE-ADENINE DINUCLEOTIDE-NITRITE REDUCTASE FROM *Azotobacter chroococcum*
J.M. Vega, M.G. Guerrero, E. Leadbetter and M. Losada
Biochem. J. 133:701-708 (1973)
- 56a. NITRITE PHOTOREDUCTION BY A CELL-FREE PREPARATION OF *Anacystis nidulans*
M.G. Guerrero, C. Manzano and M. Losada
Plant Sci. Lett. 3:273-278 (1974)
- 57a. FERREDOXIN-DEPENDENT PHOTOSYNTHETIC REDUCTION OF NITRATE AND NITRITE BY PARTICLES OF *Anacystis nidulans*
C. Manzano, P. Candau, C. Gómez-Moreno, A. M. Relímpio and M. Losada
Mol. Cell. Biochem. 10:161-169 (1976)

- 58a. NITRATE REDUCTASE INACTIVATION AND REDUCING POWER AND ENERGY CHARGE IN *Chlorella* CELLS
A. Chapafro, J.M. Maldonado, J. Diez, A.M. Relimpio and M. Losada
Plant Sci. Lett. 6:335-342 (1976)
- 59a. BIOCONVERSION OF LIGHT ENERGY INTO CHEMICAL ENERGY THROUGH REDUCTION WITH WATER OF NITRATE TO AMMONIA
P. Candau, C. Manzano and M. Losada
Nature 262:715-717 (1976)
- 60a. INACTIVATION BY AMMONIA OF THE PHOTOSYNTHETIC REDUCTION OF NITRATE IN *Nostoc muscorum* PARTICLES
T. Ortega, F. Castillo, J. Cárdenas and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75:823-831 (1977)
- 61a. LOS DISTINTOS TIPOS DE FOTOSINTESIS Y SU REGULACION
M. Losada
Investigación y Ciencia 7:6-18 (1977)
- 62a. METABOLIC INTERCONVERSION OF FERREDOXIN-NITRATE REDUCTASE AND NADP REDUCTASE OF *Nostoc muscorum*
T. Ortega, J. Rivas, J. Cárdenas and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:185-193 (1977)
- 63a. ENERGY-TRANSDUCING REDOX SYSTEMS AND THE MECHANISM OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION
M. Losada
Bioelectrochem. Bioenerg. 5:296-310 (1978)
- 64a. PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA AND HYDROGEN PEROXIDE
M. Losada
Bioelectrochem. Bioenerg. 6:205-225 (1979)

- 65a. PURIFICATION AND PROPERTIES OF ASSIMILATORY NITRATE REDUCING NAD(P)H FROM *Ankistrodesmus braunii*
M.A. de la Rosa, J. Díez, J.M. Vega and M. Losada
Eur. J. Biochem. 106:249-256 (1980)
- 66a. FERREDOXIN-DEPENDENT ENZYMATIC REDUCTION OF NITRATE WITH A DEAZAFLAVIN PHOTOSYSTEM
P. Candau, C. Manzano, M.G. Guerrero and M. Losada
Photobiochem. Photobiophys. 1:167-174 (1980)
- 67a. SHORT TERM AMMONIUM INHIBITION OF NITRATE UTILIZATION BY *Anacystis nidulans* AND OTHER CYANOBACTERIA
E. Flores, M.G. Guerrero and M. Losada
Arch. Microbiol. 128:137-144 (1980)
- 68a. NITRATE AND NITRITE AS «IN VIVO» QUENCHERS OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN BLUE-GREEN ALGAE
A. Serrano, J. Rivas and M. Losada
Photosynthesis Res. 2:175-184 (1981)
- 69a. PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA FROM NITRATE BY *Anacystis nidulans* CELLS
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 679:323-330 (1982)
- 70a. CHANGES IN FLUORESCENCE SPECTRA BY NITRATE AND NITRITE IN A BLUE-GREEN ALGA
A. Serrano, J. Rivas and M. Losada
Photobiochem. Photobiophys. 4:257-264 (1982)
- 71a. PHOTOSYNTHETIC PRODUCTION OF AMMONIA
M.G. Guerrero, J.L. Ramos and M. Losada
Experientia 38:53-58 (1982)
- 72a. OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR AMMONIA PHOTOPRODUCTION BY *Anacystis nidulans* CELLS
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
Appl. Environ. Microbiol. 44:1013-1019 (1982)

- 73a. SUSTAINED PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA FROM NITRATE BY *Anacystis nidulans* CELLS
J.L. Ramós, M.G. Guerrero and M. Losada
Appl. Environ. Microbiol. 44:1020-1025 (1982)
- 74a. CONVERSION BIOLÓGICA DE LA ENERGÍA SOLAR
M. García Guerrero y M. Losada
Mundo Científico 26:616-630 (1983)
- 75a. STABILIZATION BY HIGH pH OF HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION WITH FLAVIN PHOTOSYSTEMS
M.A. de la Rosa, J.A. Navarro, F.F. de la Rosa and M. Losada
Photobiochem. Photobiophys. 5:93-103 (1983)
- 76a. PHOTOSYNTHETIC NATURE OF NITRATE UPTAKE AND REDUCTION IN THE CYANOBACTERIUM *Anacystis nidulans*
E. Flores, M.G. Guerrero and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 722:408-416 (1983)
- 77a. pH-DEPENDENT INTERCONVERSION BETWEEN THE TWO REDOX FORMS OF CHLOROPLASTS CYTOCHROME *b*-559
F. Galván, F.F. de la Rosa, M. Hervás and M. Losada
Bioelectrochem. Bioenerg. 10:413-426 (1983)
- 78a. ENERGY TRANSDUCTION BY BIOELECTROCHEMICAL SYSTEMS
M. Losada, M. Hervás, M.A. de la Rosa and F.F. de la Rosa
Bioelectrochem. Bioenerg. 11:193-230 (1983)
- 79a. REGULATORY INTERACTION OF PHOTOSYNTHETIC NITRATE UTILIZATION AND CARBON DIOXIDE FIXATION IN THE CYANOBACTERIUM *Anacystis nidulans*
E. Flores, J.M. Romero, M.G. Guerrero and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 725:529-532 (1983)

- 80a. STUDIES ON THE ONE- AND TWO-ELECTRON FAD-MEDIATED REACTIONS BY FERREDOXIN-NADP⁺ OXIDOREDUCTASE FROM *Anabaena*
A. Serrano, J. Rivas and M. Losada
FEBS Lett. 170:85-88 (1984)
- 81a. PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLUTATHIONE REDUCTASE FROM THE CYANOBACTERIUM *Anabaena* sp. STRAIN 7119
A. Serrano, J. Rivas and M. Losada
J. Bacteriol. 158:317-324 (1984)
- 82a. SUSTAINED PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA FROM DINITROGEN AND WATER BY THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *Anabaena* sp. STRAIN ATCC 33047
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
Appl. Environ. Microbiol. 48:114-118 (1984)
- 83a. COUPLING BETWEEN REDOX AND ACID-BASE ENERGY BY CYTOCHROME *b*-564 IN A BAKER'S YEAST MITOCHONDRIA
M. Hervás, F.F. de la Rosa, M.A. de la Rosa and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:807-814 (1984)
- 84a. LOCATION AND FUNCTION OF CYTOCHROME *b*-559 IN THE CHLOROPLAST NONCYCLIC ELECTRON TRANSPORT CHAIN
M. Hervás, J.M. Ortega, M.A. de la Rosa, F.F. de la Rosa and M. Losada
Physiol. Veg. 23:593-604 (1985)
- 85a. UN CONCEPTO UNIFICADO DE TRANSDUCCION DE ENERGIA POR LOS SISTEMAS BIOQUIMICOS
M. Losada
Arch. Biol. Med. Exp. 19:29-56 (1986)

- 86a. FACTORS AFFECTING THE PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA FROM DINITROGEN AND WATER BY THE CYANOBACTERIUM *Anabaena* sp. STRAIN ATCC 33047
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
Biotech. Bioeng. 29:566-571 (1987)
- 87a. PURIFICATION AND PROPERTIES OF NADP-DEPENDENT NON-PHOSPHORYLATING GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM THE GREEN ALGA *Chlamydomonas reinhardtii*
A. Iglesias, A. Serrano, M.G. Guerrero and M. Losada
Biochim. Biophys Acta 925:1-10 (1987)
- 88a. FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF BIOMASS BY A NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGA IN OUTDOOR CULTURE
A.G. Fontes, M.A. Vargas, J. Moreno, M.G. Guerrero and M. Losada
Biomass 13:33-43 (1987)
- 89a. PURIFICATION AND KINETIC AND STRUCTURAL PROPERTIES OF SPINACH LEAF NADP-DEPENDENT NON-PHOSPHORYLATING GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
A.A. Iglesias and M. Losada
Arch. Biochem. Biophys. 260:830-840 (1988)
- 90a. REDOX AND ACID BASE CHARACTERIZATION OF CYTOCHROME *b*-559 IN PHOTOSYSTEM II PARTICLES
J.M. Ortega, M. Hervás and M. Losada
Eur. J. Biochem. 171:449-455 (1988)
- 91a. ACTION SPECTRA FOR NITRATE AND NITRITE ASSIMILATION IN BLUE-GREEN ALGA
A. Serrano and M. Losada
Plant Physiol. 86:1116-1119 (1988)

- 92a. RESTORATION OF HIGH POTENTIAL CYTOCHROME *b*-564 BY INTEGRATION OF BAKER'S YEAST COMPLEX III INTO LIPOSOMES
M. Hervás, J.M. Ortega, F.F. de la Rosa and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 152:981-986 (1988)
- 93a. A NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM WITH A HIGH PHYCOERYTHRIN CONTENT
H. Rodríguez, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
Appl. Environ. Microbiol. 55:758-760 (1989)
- 94a. ISOLATION AND COMPARISON OF MOLECULAR PROPERTIES OF CYTOCHROME *b*-559 FROM BOTH SPINACH THYLAKOIDS AND PS II PARTICLES
J.M. Ortega, M. Hervás and M. Losada
Z. Naturforsch. 44c:415-422 (1989)
- 95a. LOCATION OF CYTOCHROME *b*-559 BETWEEN PHOTOSYSTEM II AND PHOTOSYSTEM I IN NONCYCLIC ELECTRONS TRANSPORT
J.M. Ortega, M. Hervás and M. Losada
Biochim. Biophys. Acta 975:244-251 (1989)
- 96a. DISTINCTIVE STABILITY OF THE REDUCED AND OXIDIZED FORMS OF HIGH-POTENTIAL CYTOCHROME *b*-559 IN PHOTOSYSTEM II PARTICLES
J.M. Ortega, M. Hervás and M. Losada
Plant Sci. 68:71-75 (1990)
- 97a. Ca²⁺ REQUIREMENT FOR AEROBIC NITROGEN FIXATION BY HETEROCYSTOUS BLUE-GREEN ALGAE
H. Rodríguez, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
Plant Physiol. 92:886-890 (1990)
- 98a. CHANGES IN THE PIGMENT CONTENT OF *Anabaena variabilis* CELLS IN OUTDOOR CULTURE
A.G. Fontes, M.A. Vargas, J. Moreno, M.G. Guerrero and M. Losada
J. Plant Physiol. 137:441-445 (1991)

- 99a. ENHANCEMENT OF PHYCOBILIPROTEIN PRODUCTION IN NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIA
H. Rodríguez, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
J. Biotechnol. 20:263-270 (1991)
- 100a. DIFFERENTIAL REGULATION BY TROPHIC CONDITIONS OF PHOSPHORYLATING AND NON-PHOSPHORYLATING NADP⁺-DEPENDENT GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN *Chlorella fusca*
A. Serrano, M.I. Mateos and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 181:1077-1083 (1991)
- 101a. THE DOUBLE FUNCTION OF OXYGEN IN BIOENERGETICS
M. Losada
Bioelectrochem. Bioenerg. 28:31-42 (1992)
- 102a. ATP-DRIVEN TRANSHYDROGENATION AND IONIZATION OF WATER IN A RECONSTITUTED GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASES (PHOSPHORYLATING AND NON-PHOSPHORYLATING) MODEL SYSTEMS
A. Serrano, M.I. Mateos and M. Losada
Biochem. Biophys. Res. Commun. 197:1348-1356 (1994)
- 103a. REDOX PROPERTIES OF CYTOCHROME *b*-559 IN PHOTOSYNTHETIC MEMBRANES FROM THE CYANOBACTERIUM *Synechocystis* sp. PCC 6803
J.M. Ortega, M. Hervás, M.A. De la Rosa and M. Losada
J. Plant Physiol. 144:454-461 (1994)
- 104a. WELCOME ADDRESS
M. Losada
Bioelectrochem. Bioenerg. 38:1-7 (1995)
- 105a. pH-DEPENDENT PHOTOREACTIONS OF THE HIGH- AND LOW-POTENTIAL FORMS OF CYTOCHROME *b*-559 IN SPINACH PS II-ENRICHED MEMBRANES
J.M. Ortega, M. Hervás, M.A. De la Rosa and M. Losada
Photosynthesis Res. 46:185-191 (1995)

- 106a. DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL PROF. MANUEL LOSADA AL PROF. BENITO VALDES EN SU TOMA DE POSESIÓN COMO ACADEMICO DE LA ACADEMIA IBEROAMERICANA DE FARMACIA
M. Losada
Ars Pharmaceutica 37:627-676 (1996)
- 107a. FUNCTIONAL COMPLEMENTATION OF AN *Escherichia coli gap* MUTANT SUPPORTS AN AMPHIBOLIC ROLE FOR NAD(P)-DEPENDENT GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE OF *Synechocystis* SP. STRAIN PCC 6803
F. Valverde, M. Losada and A. Serrano
J. Bacteriology 179:4513-4522 (1997)

b) Trabajos de investigación (Libros)

- 1b. PHOTOPRODUCTION OF MOLECULAR HYDROGEN FROM THIOSULFATE BY *Chromatium* CELLS
M. Losada, M. Nozaki and D.I. Arnon
In: «Light and Life». Eds. W.D. McElroy and B. Glass. pp. 570-575. Johns Hopkins Press, Baltimore (1961)
- 2b. LA FOSFORILACION Y LOS DISTINTOS TIPOS DE FOTOSINTESIS
M. Losada
En: «Enciclopedia ESCYT, Vol.6». pp. 247-250. Editorial Salvat, Barcelona (1964)
- 3b. REDUCTION OF NITRATE TO AMMONIA IN CHLOROPLASTS
M. Losada, A. Paneque, J.M. Ramirez and F.F. del Campo
In: «Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion». Ed. A. San Pietro. pp. 211-219. Antioch Press, Yellow Springs, Ohio (1965)

- 4b. CONCEPTOS ACTUALES EN FOTOSÍNTESIS Y QUIMIO-SÍNTESIS
M. Losada
En: «Problemas Modernos de Ciencias Naturales». pp. 91-111. Publicaciones de la Dirección General de Enseñanza Media, Madrid (1965)
- 5b. NITRATE ASSIMILATION IN A RECONSTITUTED CHLOROPLAST SYSTEM
M. Losada
In: «Current in Photosynthesis». Eds. J.B. Thomas and J.C. Goedheer. pp. 431-439. Ad. Donker, Rotterdam (1966)
- 6b. SEPARATION OF TWO ENZYME ACTIVITIES IN THE REDUCTION OF NITRATE WITH NADH
M. Losada, P.J. Aparicio and A. Paneque
In: «Progress in Photosynthesis Research, Vol. III». Ed. H. Metzner. pp. 1504-1509. IUBS, Tübingen (1969)
- 7b. THE ASSIMILATORY NITRATE REDUCING SYSTEM AND ITS REGULATION BY AMMONIA IN *Chlorella*
M. Losada
In: «Metabolic Interconversion of Enzymes». pp. 59-64. Italy (1970)
- 8b. O.T. AVERY
M. Losada
En: «Gran Enciclopedia Rialp, Vol. III». pp. 489-490. Ediciones Rialp, Madrid (1971)
- 9b. CLOROFILA
M. Losada
En: «Gran Enciclopedia Rialp, Vol. V». pp. 790-791. Ediciones Rialp, Madrid (1971)
- 10b. THE ROLE OF MOLYBDENUM AND IRON IN THE ASSIMILATORY REDUCTION OF NITRATE
M. Losada
In: «International Biochemistry Meeting». pp 139-141. Italy (1971)

- 11b. FOTOSINTESIS
 M. Losada
 En: «Gran Enciclopedia Rialp, Vol. X». pp. 380-383. Ediciones Rialp, Madrid (1972)
- 12b. S. OCHOA
 M. Losada
 En: «Gran Enciclopedia Rialp, Vol. XVII». pp. 222-223. Ediciones Rialp, Madrid (1973)
- 13b. INTERCONVERSION OF NITRATE AND NITRITE REDUCTASE OF THE ASSIMILATORY TYPE
 M. Losada
 In: «Metabolic Interconversion of Enzymes 1973». Eds. E.H. Fisher, E.G. Krebs, H. Neurath and E.R. Stadtman. pp. 257-270. Springer Verlag, Berlin (1974)
- 14b. METALLOENZYMES OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM
 M. Losada
 In: «Enzymatic and Homogeneous Catalysis». pp. 17-20. España (1975)
- 15b. PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA AND HYDROGEN PEROXIDE
 M. Losada
 In: «Bioenergy. Energy by Living Systems». pp. 147-183. Goettlieb Duttweiler-Institute, Zurich (1978)
- 16b. CYTOCHROME *b*-559 AS AN ENERGY-TRANSDUCING REDOX SYSTEM IN NONCYCLIC PHOTOPHOSPHORYLATION
 F.F. de la Rosa, F. Galván and M. Losada
 In: «Photosynthesis, Vol. 2». Ed. G. Akoyunoglou. pp. 531-541. Balaban Internat. Sci. Serv., Philadelphia (1981)

- 17b. PHOTOPRODUCTION OF AMMONIA FROM DINITROGEN BY WHOLE CELLS OF BLUE-GREEN ALGAE
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada.
In: «Photosynthesis, Vol. 6». Ed. G. Akoyunoglou. pp. 707-717. Balaban Internat. Sci. Serv., Philadelphia (1981)
- 18b. PHOTOBIOLOGICAL PRODUCTION OF AMMONIA BY BLUE-GREEN ALGAE
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «Solar World Forum». Eds. D.O. Hall and J. Morton. pp. 2248-2254. Pergamon Press, Brighton (1982)
- 19b. PRODUCTION OF HIGH-QUALITY BIOMASS BY NITROGEN-FIXING ALGAE
A.G. Fontes, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «Energy from Biomass (2nd E.C. Conference)». Eds. A. Strub, P. Chartier and G. Schlessler. pp. 265-269. Applied Science Pub., London-New York (1983)
- 20b. PROTEIN FROM NITROGEN-FIXER CHEMOTROPHIC BACTERIA
A. Paneque, J. Moreno, A. Llobell and M. Losada
In: «Energy from Biomass (2nd E.C. Conference)». Eds. A. Strub, P. Chartier and G. Schlessler. pp. 270-274. Applied Science Pub., London-New York (1983)
- 21b. OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR AMMONIA PHOTOPRODUCTION BY THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM *Anabaena* sp. STRAIN ATCC 33047
J.L. Ramos, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «Commercial Applications and Implications of Biotechnology (Biotech 83)». pp 877-884. Online Pub. Ltd., Northwood (1983)
- 22b. FOTOSÍNTESIS DE AMONÍACO A PARTIR DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO Y AGUA POR ALGAS VERDE-AZULADAS
J.L. Ramos, M.G. Guerrero y M. Losada
En: «Energía Solar, Vol. 1». Eds. M. Collares, A. Luque y A. Silverio. pp. III.2-III.14. ISES España-Portugal, Lisboa (1983)

- 23b. APROVECHAMIENTO DE LA ENERGIA SOLAR PARA LA PRODUCCION DE AGUA OXIGENADA UTILIZANDO FLAVINAS CÓMO FOTOSENSIBILIZADORES
M.A. de la Rosa, J.A. Navarro, M. Hervás, F.F. de la Rosa y M. Losada
En: «Energía Solar, Vol. 1». Eds. M. Collares, A. Luque y A. Silverio. pp. III.30-III.41. ISES España-Portugal, Lisboa (1983)
- 24b. GENERACION DE H₂O₂ POR FLAVINAS ILUMINADAS: EFECTO DEL CO₂ Y POSIBILIDADES DEL FOTOSISTEMA
J.A. Navarro, M. Roncel, M.A. de la Rosa, F.F. de la Rosa y M. Losada
En: «II Reunión Científica de Microbiología Industrial». pp. 1-9. Sevilla (1983)
- 25b. PRODUCCION DE AMONIACO POR *Azotobacter chroococcum*
A. de la Torre, F.J. Cejudo, J. Moreno, A. Paneque y M. Losada
En: «II Reunión Científica de Microbiología Industrial». pp. 10-24. Sevilla (1983)
- 26b. PRODUCCION DE BIOMASA DE CALIDAD POR EL ALGA VERDE-AZULADA FIJADORA DE NITROGENO *Anabaena variabilis*
A.G. Fontes, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
En: «II Reunión Científica de Microbiología Industrial». pp. 25-33. Sevilla (1983)
- 27b. BIOCONVERSION DE LA ENERGIA SOLAR
M.G. Guerrero y M. Losada
En: «El Libro del Año 1983». pp. 247-251. Editorial Salvat, Barcelona (1983)
- 28b. COUPLING BETWEEN REDOX AND ACID-BASE ENERGIES BY CHLOROPLAST CYTOCHROME *b*-559
M. Hervás, F.F. de la Rosa, M.A. de la Rosa and M. Losada
In: «Advances in Photosynthesis Research, Vol. II». Ed. C. Sybesma. pp. 419-422. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub., The Hague (1984)

- 29b. STUDIES OF GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN THE CYANOBACTERIUM *Anabaena* sp. STRAIN 7119
 A. Serranó, J. Rivas and M. Losada
 In: «Advances in Photosynthesis Research, Vol. II». Ed. C. Sybesma. pp. 711-714. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub., The Hague (1984)
- 30b. REGULATION OF NITRATE UTILIZATION BY CO₂ FIXATION PRODUCTS IN THE CYANOBACTERIUM *Anacystis nidulans*
 C. Lara, J.M. Romero, E. Flores, M.G. Guerrero and M. Losada
 In: «Advances in Photosynthesis Research, Vol. II». Ed. C. Sybesma. pp. 715-718. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub., The Hague (1984)
- 31b. EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON THE PRODUCTIVITY OF THE NITROGEN FIXING BLUE-GREEN ALGA *Anabaena variabilis* UNDER OUTDOOR CONDITIONS
 A.G. Fontes, J. Moreno, M.A. Vargas, M.G. Guerrero and M. Losada
 In: «Energy from Biomass (3rd E.C. Conference)». Eds. W. Palz, J. Coombs and D.O. Hall. pp. 393-397. Applied Science Pub., London-New York (1985)
- 32b. PHOTOPRODUCTION OF ALGAL BIOMASS: EFFECT OF CARBON SUPPLY AND TURBULENCE ON THE PRODUCTIVITY OF *Nostoc* sp
 H. Rodríguez-Martínez, J. Rivas, M.G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada
 In: «La Energía Solar en la Cooperación Norte-Sur». Eds. V. Ruiz y M.G. Guerrero. pp. 193-198. ADESA, Sevilla (1985)
- 33b. CYTOCHROME *b*-559 AS AN ENERGY-TRANSDUCER IN THE CHLOROPLAST ELECTRON TRANSPORT CHAIN BETWEEN THE TWO PHOTOSYSTEMS
 M. Hervás, J.M. Ortega, M.A. de la Rosa, F.F. de la Rosa and M. Losada
 In: «La Energía Solar en la Cooperación Norte-Sur». Eds. V. Ruiz y M.G. Guerrero. pp. 199-205. ADESA, Sevilla (1985)

- 34b. EVALUATION OF TWO SHAKING SYSTEMS FOR ALGAL BIOMASS PHOTOPRODUCTION IN OUTDOOR SEMICONTINUOUS CULTURES OF *Anabaena variabilis*
M.A. Vargas, J. Moreno, A.G. Fontes, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «La Energía Solar en la Cooperación Norte-Sur». Eds. V. Ruiz y M.G. Guerrero. pp. 207-212. ADESA, Sevilla (1985)
- 35b. FOTOSINTESIS
C. Lara, A. de la Torre, M.G. Guerrero y M. Losada
En: «Bioquímica». Dirigido por E. Herrera. pp. 445-476. Editorial Interamericana, México (1986)
- 36b. PHOTOSYNTHETIC ASSIMILATION OF THE PRIMORDIAL BIOELEMENTS
M. Losada, M. Hervás and J.M. Ortega
In: «Inorganic Nitrogen Metabolism». Eds. W.R. Ullrich, P.J. Aparicio, P.J. Syrett and F. Castillo. pp. 3-15. Springer, Berlin (1987)
- 37b. SEQUENTIAL TRANSDUCTION OF SOLAR ENERGY INTO CHEMICAL ENERGY BY THE PLANT KINGDOM
M. Losada
In: «Renewable Energy Sources, Vol. I». Ed. S. Terol. pp. 44-59. CSIC, Madrid (1987)
- 38b. SELECTION OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE FOR BIOMASS PHOTOPRODUCTION
H. Rodríguez-Martínez, J. Rivas, M.G. Guerrero, A. Paneque and M. Losada
In: «Renewable Energy Sources, Vol. I». Ed. S. Terol. pp. 183-190. CSIC, Madrid (1987)
- 39b. EFFECT OF SEVERAL PARAMETERS ON THE PRODUCTIVITY OF A NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGA IN OUTDOOR SEMICONTINUOUS CULTURE
J. Moreno, M.A. Vargas, A.G. Fontes, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «Renewable Energy Sources, Vol. I». Ed. S. Terol. pp. 206-211. CSIC, Madrid (1987)

- 40b. LA ASIMILACION FOTOSINTETICA DE LOS BIOELEMENTOS FUNDAMENTALES
M. Losada
En: «Química Agrícola y Alimentaria-2, Vol. 1», Publications Series no. 68. pp. 19-42. European Federation of Chemical Engineering, Sevilla (1987)
- 41b. CYTOCHROME *b*-559 AS A TRANSDUCER OF REDOX ENERGY INTO ACID-BASE ENERGY IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada, M. Hervás and J.M. Ortega
In: «Photocatalytic Production of Energy-Rich Compounds». Eds. D.O. Hall and G. Grassi. pp. 169-179. Elsevier Applied Science Publishers, London (1988)
- 42b. OUTDOOR CULTURE OF SELECTED NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE FOR THE PRODUCTION OF HIGH-QUALITY BIOMASS
M.G. Guerrero, A.G. Fontes, J. Moreno, J. Rivas, H. Rodríguez-Martínez, M.A. Vargas and M. Losada
In: «Photocatalytic Production of Energy-Rich Compounds». Eds. D.O. Hall and G. Grassi. pp. 225-232. Elsevier Applied Science Publishers, London (1988)
- 43b. TRANSDUCTION OF REDOX ENERGY INTO ACID-BASE ENERGY BY CYTOCHROME *b*-559 AT THE COUPLING SITE BETWEEN PS II AND PS I IN NONCYCLIC PHOTOPHOSPHORYLATION
M. Losada, M. Hervás and J.M. Ortega
In: «Photoconversion Processes for Energy and Chemicals». Eds. D.O. Hall and G. Grassi, pp. 218-228. Elsevier Applied Science Publishers, London (1989)
- 44b. EFFECT OF IRRADIANCE ON PRODUCTIVITY AND PIGMENT COMPOSITION OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE
M.G. Guerrero, H. Rodríguez, J. Moreno, J. Rivas, M.A. Vargas, A.G. Fontes and M. Losada

In: «Photoconversion Processes for Energy and Chemicals». Eds. D.O. Hall and G. Grassi, pp. 248-257. Elsevier Applied Science Publishers, London (1989)

- 45b. SEQUENTIAL ENERGY TRANSDUCTION IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada, M.G. Guerrero, M.A. de la Rosa, A. Serrano, M. Hervás and J.M. Ortega
In:» Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms». Eds. W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi and P.J. Aparicio. pp. 21-27. Springer Verlag, Berlin (1990)
- 46b. CULTIVATIONS OF NITROGEN-FIXING MICROALGAE FOR THE GENERATION OF PRODUCTS WITH COMMERCIAL INTEREST
M.G. Guerrero, M.A. Vargas, J. Rivas, H. Rodríguez, J. Moreno and M. Losada
In: «From Genes to Bioproducts». Ed. Organizing Committee of BIOTEC-90. pp. 91-97. DM PPU, Murcia-Barcelona (1990)
- 47b. SEQUENTIAL ENERGY TRANSDUCTION IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada
In: «Trends in Photosynthesis Research». Eds. M.G. Guerrero, H. Medrano and E. Tortosa. pp. 115-123. Inst. Estudios Avanzados Islas Baleares, Palma de Mallorca (1990)
- 48b. PALABRAS DEL DOCTOR D. MANUEL LOSADA VILLASANTE
En: «Acto de Entrega del Primer Premio a la Investigación **Rey Jaime I 1989**. pp. 13-20. Petromed, Generalitat Valenciana y Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (1990)
- 49b. PRODUCCION FOTOSINTETICA DE COMPUESTOS DE INTERES PRACTICO POR MICROALGAS
M. G. Guerrero y M. Losada
En: «Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, Vol. I. Fotosíntesis». Colección «Nuevas Tendencias». pp. 169-182. CSIC, Madrid (1991)

- 50b. EL SOL FUENTE DE ENERGIA Y VIDA
M. Losada
En: «En el Umbral del Tercer Milenio». Comité de Expertos de la Exposición Universal Sevilla 92. pp. 131-138. Tabapress, S.A., Madrid (1992)
- 51b. A POSSIBLE ROLE FOR CYTOCHROME *b*-559 IN PHOTOSYNTHESIS
J.M. Ortega, M. Hervás and M. Losada
In: «Research in Photosynthesis. Vol. 2». Ed. N. Murata. pp. 697-700. Kluwer Academic Pub., Dordrecht (1992)
- 52b. PRODUCTION OF PHYCOBILIPROTEINS AND EXOPOLYSACCHARIDES BY NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGA (CYANOBACTERIA). EFFECT OF ENVIRONMENTAL AND NUTRITIONAL FACTORS
H. Rodríguez, M.A. Vargas, J. Moreno, J. Rivas, M.G. Guerrero and M. Losada
In: «Algology». Eds. P. Kretschmer, O. Pulz and C. Gudin. pp. 27-33. Institute für Getreideverarbeitung, Postdam-Rehbrücke (1992)
- 53b. CLONACION DEL GEN DE LA GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA DE LA CIANOBACTERIA *Synechocystis sp.* PCC 6803 POR COMPLEMENTACION *in vivo* EN *Escherichia coli*
F. Valverde, A. Serrano y M. Losada
En: «Biología Molecular de Plantas». Eds. Beltrán y V. Conejero. pp. 210-212. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia (1993)
- 54b. MATERIA, ENERGIA Y VIDA
M. Losada
En: «Descifrar la Vida. Ensayos de Historia de la Biología». Eds. J. Casadesús y F. Ruíz Berraquero. pp. 9-29. Publicaciones de la Universidad de Sevilla (1994)

- 55b. CLONING BY FUNCTIONAL COMPLEMENTATION IN *E. coli* OF THE *gap2* GENE OF *Synechocystis* sp. PCC 6803 SUPPORTS AN AMPHIBOLIC ROLE FOR CYANOBACTERIAL NAD(P)-DEPENDENT GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE.
 F. Valverde, M. Losada, and A. Seirano
 In: «Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. I». Ed P. Mathis. pp. 959-962. Kluwer Academic Publ., Dordrecht (1995). ISBN 0-7923-3857-X
- 56b. FERREDOXIN OXIDATION IN CYCLIC ELECTRON TRANSPORT IN THE CYANOBACTERIUM *Synechocystis* PCC 6803
 M. Roncel, J.M. Ortega and M. Losada
 In: «Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. II». Ed P. Mathis. pp. 59-62. Kluwer Academic Publ., Dordrecht (1995). ISBN 0-7923-3858-8
- 57b. PHOTOREACTIONS OF HIGH- AND LOW-POTENTIAL CYTOCHROME *b559* DURING PHOTOINHIBITION
 J.M. Ortega, M. Hervás, M.A. de la Rosa and M. Losada
 In: «Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. IV». Ed P. Mathis. pp. 251-254. Kluwer Academic Publ., Dordrecht (1995). ISBN 0-7923-3860-X
- 58b. CARACTERIZACION DE LOS ENZIMAS DEL METABOLISMO ENERGETICO DEL PIROFOSFATO DE MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS Y SU UTILIDAD COMO SISTEMAS MODELO EN BIOENERGÉTICA.
 M.R. Gómez, M. Losada y A. Serrano
 En: «III Reunión de Biología Molecular de Plantas». Eds. J.A. Palomares y J.A. Pintor Toro. pp. 152-153. Dirección General de Investigación Agraria de la Junta de Andalucía, Sevilla (1995). ISBN 84-87564-34-8

- 59b. FARMACEUTICOS E INVESTIGACIÓN. ALBAREDA Y LORA-TAMAYO: DOS GRANDES MAESTROS
M. Losada
En: «Un Siglo de la Farmacia en España». Ed. Centro Farmacéutico Nacional. pp. 389-400. Madrid (1995). ISBN 84-605-4088-X
- 60b. AGRADECIMIENTO AL ACTO HOMENAJE DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA
M. Losada
En: «Manuel Losada: Maestro de Científicos». Ediciones Especiales nº 17. J.Mª Vega, ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. pp.47-57. Sevilla (1996). ISBN 84-472-0317-4
- 61b. CYANOBACTERIAL AND ALGAL INORGANIC PYROPHOSPHATASES AND THE MOLECULAR PHYLOGENY OF THE HIGHER PLANT ENZYME
R. Gómez, M. Losada and A. Serrano
En: «Inorganic Pyrophosphatases». R. Lahti, ed. University of Turku Press. pp.6-9. Turku (1997). ISBN 951-29-0990-1
- 62b. PH-DEPENDENT PHOTOOXIDATION OF CYTOCHROME *b*559 IN THE PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER
J.M. Ortega, M. Roncel and M. Losada
In: «Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends». P. Carmona, R. Navarro and A. Hernández, eds. Kluwer Academic Pub. y UNED. pp. 19-20 Madrid (1997). ISBN 0-7923-4685-8
- 63b. ¿ES EL MECANISMO DE FOSFORILACIÓN OTRO HUEVO DE COLÓN?
M. Losada
En: «Libro de Resúmenes. V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal». Servicio de Publicaciones Dirección Gral. de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Colección Congresos y Jornadas 41/97. pp. 15-17 Sevilla (1997) ISBN 84-89802-12-2

- 64b. ENERGETICA DEL CITOCROMO *c*559 EN EL FOTOSISTEMA II
J.M. Ortega, M. Roncel y M. Losada
En: «Libro de Resúmenes. V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal». Servicio de Publicaciones Dirección Gral. de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Colección Congresos y Jornadas 41/97. pp. 202-203 (1997) ISBN 84-89802-12-2
- 65b LA PIROFOSFATASA DE LA MEMBRANA VACUOLAR (TONOPLASTO) DE *Antirrhinum majus*
J.R. Pérez-Castiñeira, A. Mérida, J.M. Romero, M. Losada y A. Serrano
En: «Libro de Resúmenes. V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal». Servicio de Publicaciones Dirección Gral. de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Colección Congresos y Jornadas 41/97. pp. 226-227 (1997) ISBN 84-89802-12-2
- 66b. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LAS PIROFOSFATASAS INORGÁNICAS DE ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS Y SU RELEVANCIA PARA LA FILOGENIA DE LOS PLÁSTIDOS
R. Gómez, M. Losada y A. Serrano
En: «Libro de Resúmenes. V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal». Servicio de Publicaciones Dirección Gral. de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Colección Congresos y Jornadas 41/97. pp. 228-229 (1997) ISBN 84-89802-12-2
- 67b. THE STRUCTURAL DIVERSITY OF INORGANIC PYROPHOSPHATASES OF PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS AND THE MOLECULAR PHYLOGENY OF THE HOMOLOGOUS PLASTID ENZYMES
R. Gómez, W. Löffelhardt, M. Losada y A. Serrano
En: «The photoprophic Prokaryotes». G.A. Peschek, W. Löffelhardt y G. Schemetterer, eds. Plenum Publishing Corp. New York-London (en prensa)

- 68b. DIFFERENTIAL REGULATION OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASES IN THE GREEN ALGA *Chlorella fusca*
F. Valverde, M. Losada y A. Serrano
En: «Photosynthesis: Mechanisms and Effects». G. Garab, ed. Kluwer Academic Pub. Dordrecht (1998) (en prensa)
- 69b. EVIDENCE FOR THE WIDESPREAD DISTRIBUTION OF MEMBRANE-BOUND INORGANIC PYROPHOSPHATASES AMONG PHOTOSYNTHETIC PROKARYOTES
I. García-Donas, J.R. Pérez-Castiñeira, P.A. Rea, Y. Drozdowicz, M. Baltscheffsky, M. Losada y A. Serrano
En: «Photosynthesis: Mechanisms and Effects». G. Garab, ed. Kluwer Academic Pub. Dordrecht (1998) (en prensa)
- 70b. STRUCTURAL DIVERSITY AND FUNCTIONAL CONSERVATION OF SOLUBLE INORGANIC PYROPHOSPHATASES FROM PHOTOSYNTHETIC PROKARYOTES AND PLASTIDS
R. Gómez, W. Löffelhardt, M. Losada y A. Serrano
En: «Photosynthesis: Mechanisms and Effects». G. Garab, ed. Kluwer Academic Pub. Dordrecht (1998) (en prensa)
- 71b. CHANGES IN CYTOCHROME *c*559 DURING PHOTOINHIBITION
J.M. Ortega, M. Roncel y M. Losada
En: «Photosynthesis: Mechanisms and Effects». G. Garab, ed. Kluwer Academic Pub. Dordrecht (1998) (en prensa)

c) Revisiones

- 1c. SELECTIVE INHIBITORS OF PHOTOSYNTHESIS
M. Losada and D.I. Arnon
In: «Metabolic Inhibitors, Vol. II». Ed. R.M. Hochster and J.H. Quastel. pp. 559-593. Academic Press, New York (1963)

- 2c. ENZYME SYSTEMS IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada and D.I. Arnon
En: «Modern Methods of Plant Analysis, Vol. VII». Ed. E.F. Linskens, B.D. Sanwal and M.V. Tracey. pp. 569-615. Springer Verlag, Berlin (1964)
- 3c. THE PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF PHOTOSYNTHESIS
F.R. Whatley and M. Losada
In: «Photophysiology, Vol. 1». Ed. A.C. Giese. pp. 111-154. Academic Press, New York (1964)
- 4c. LA FOTOSINTESIS Y LA ASIMILACION DEL NITROGENO
M. Losada
Publicaciones de la Universidad Internacional Menéndez y Pelayo. 45 pp. (1970)
- 5c. NITRITE REDUCTASE
M. Losada and A. Paneque
In: «Methods in Enzymology, Vol. XXIII». Ed. A. San Pietro. pp. 487-491. Academic Press, New York (1971)
- 6c. LA FOTOSINTESIS DEL NITROGENO NITRICO
M. Losada
Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias de Madrid. 102 pp. (1972)
- 7c. METALLOENZYMES OF THE NITRATE-REDUCING SYSTEM
M. Losada
J. Molec. Catal. 1:245-264 (1975/76)
- 8c. REDUCING POWER AND THE REGULATION OF PHOTOSYNTHESIS
M. Losada
In: «Reflections on Biochemistry, in honour of Severo Ochoa». Eds. A. Kornberg, B.L. Horecker, L. Cornudella and J. Oró. pp. 73-84. Pergamon Press, Oxford (1976)

- 9c. PODER REDUCTOR Y REGULACION DE LA FOTOSINTESIS
M. Losada
En: «Avances de la Bioquímica». Dirigido por L. Cornudella, J. Oró, C.F. Heredia y A. Sols. pp. 473-487. Editorial Salvat, Barcelona (1977)
- 10c. SISTEMAS BIOQUIMICOS DE CONVERSION DE LA ENERGIA SOLAR
M. Losada
In: «Energy Sources and Development, Vol. 2» pp. 32-51. Editorial Moneda y Crédito, Madrid (1978)
- 11c. THE PHOTOSYNTHETIC REDUCTION OF NITRATE AND ITS REGULATION
M. Losada and M.G. Guerrero
In: «Topics in Photosynthesis, Vol. 3». Ed J. Barber. pp. 365-408. Elsevier/North Holland, Amsterdam (1979)
- 12c. REFLEXIONES EN TORNO A LA TRANSDUCCION BIOLOGICA DE LA ENERGIA
M. Losada
Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina de Sevilla. 164 pp. (1979). ISBN 7405-145-2
- 13c. FERREDOXIN-NITRITE REDUCTASE
J.M. Vega, J. Cárdenas and M. Losada
In: «Methods in Enzymology, Vol. 69, Part C». Ed. A. San Pietro. pp. 255-270. Academic Press, New York (1980)
- 14c. THE ASSIMILATORY NITRATE-REDUCING SYSTEM AND ITS REGULATION
M.G. Guerrero, J.M. Vega and M. Losada
Ann. Rev. Plant Physiol. 32:169-204 (1981)
- 15c. THE ASSIMILATORY REDUCTION OF NITRATE
M. Losada, M.G. Guerrero and J.M. Vega
In: «Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur». Eds. H. Bothe and A. Trebst. pp. 30-63. Springer Verlag, Berlin (1981)

- 16c. THE PHOTOSYNTHETIC ASSIMILATION OF NITRATE AND ITS REGULATION
M. Losada, J.M. Vega and M.G. Guerrero
In: «Photosynthesis, Vol. 4». Ed. G. Akoyunoglou. pp. 693-705. Balaban Internat. Sci. Serv., Philadelphia (1981)
- 17c. PHOTOSYNTHETIC PRODUCTION OF AMMONIA
M.G. Guerrero, J.L. Ramos and M. Losada
In: «New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems». Eds. M. Mislin and R. Bachofen. pp. 59-64. Birkhäuser Verlag, Basel (1982)
- 18c. ASIMILACION FOTOSINTETICA DEL NITROGENO
M. Losada y M.G. Guerrero
En: «Bioquímica y Biología Molecular». Dirigido por S. Ochoa, L.F. Leloir, J. Oro y A. Sols. pp. 108-115. Editorial Salvat, Barcelona (1986)
- 19c. TREINTA AÑOS DE INVESTIGACION EN BIOENERGETICA
M. Losada
Discurso de Apertura del Curso Académico 1987-88. 88 pp. Publicaciones Universidad de Sevilla, Sevilla (1987)
- 20c. SEQUENTIAL TRANSDUCTION OF LIGHT INTO REDOX AND ACID-BASE ENERGY IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada, M.G. Guerrero, M. A. de la Rosa, A. Serrano, M. Hervás y J.M. Ortega
Bioelectrochem. Bioenerg. 23:105-128 (1990)
- 21c. DISCURSO DE CONTESTACION AL LEIDO POR EL DR. FRANCISCO GARCIA NOVO EN SU TOMA DE POSESIÓN COMO ACADEMICO
M. Losada
En: «Memoria '86-'89 de la Academia Sevillana de Ciencias». pp. 185-254 (1991)

- 22c. ¿QUE ES LA VIDA?
M. Losada
Discurso protocolario de la Inauguración Oficial del 292 Año Académico de la Real Academia de Medicina de Sevilla. 135 pp. (1992)
- 23c. SEQUENTIAL ENERGY TRANSDUCTION IN PHOTOSYNTHESIS
M. Losada
In: «Trends in Photosynthesis Research». Eds. J. Barber, M.G. Guerrero and H. Medrano. pp. 87-102. Intercept Ltd., Andover (Inglaterra) (1992)
- 24c. FOTOSÍNTESIS: SOL, AGUA, TIERRA Y AIRE
M.A. de la Rosa, M. García Guerrero y M. Losada
Mundo Científico 138:744-755 (1993)

B) LIBROS

1. pH-METRIA. Prácticas de Bioquímica, Tomo II
J. López-Barea, C. Gómez-Moreno, J. Rivas y M. Losada
Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 80 pp (1974). ISBN 84-85057-26-0
2. MANOMETRIA. Prácticas de Bioquímica, Tomo IV
M.G. Guerrero, C. Manzano, J. Cárdenas y M. Losada
Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 68 pp. (1974). ISBN 84-85057-26-0
3. POTENCIOMETRIA Y BIOENERGÉTICA. Prácticas de Bioquímica, Tomo III
A.M. Relimpio, J.M. Vega, M.G. Guerrero y M. Losada
Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 298 pp. (1977). ISBN 84-7405-077-4
4. FOTOBIOQUÍMICA
M.A. de la Rosa, M. Hervás, A. Serrano y M. Losada
Editorial Síntesis, Madrid. 254 pp. (1990). ISBN 84-7738-094-

5. OCHOA, HOMBRE DE CIENCIA Y DE BIEN
M. Losada
Universidad de Sevilla, Sevilla. 58 pp. (1994). ISBN 84-472-0181-1
6. ACTAS DEL II CENTENARIO DE DON ANTONIO DE ULLOA
Editores: M. Losada y C. Varela
Escuela de Estudios Hispanoamericanos (CSIC) y Archivo General de Indias, Sevilla. 279 pp. (1995). ISBN 84-00-07523-4
7. DISCURSO DE INVESTIDURA DOCTOR HONORIS CAUSA POR LA UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA.
M. Losada
Dirección de Publicaciones y Difusión Científica, Universidad Pública de Navarra. 31 pp. Pamplona (1997).D.L.NA 848-1997
8. LOS ELEMENTOS Y MOLECULAS DE LA VIDA. INTRODUCCIÓN A LA QUÍMICA BIOLÓGICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. Primera Parte
M. Losada, M.A. Vargas, M.A. De la Rosa y F.J. Florencio
Editorial Rueda. 623 pp. ISBN 84-7207-109-X (1998)