

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2003

VOLUMEN LXIX

Núm. 1

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

**Sesión Extraordinaria conmemorativa del
Bicentenario del nacimiento de Justus von Liebig
(1803-1873)**

Apertura

ANTONIO PORTOLÉS ALONSO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo. Sr. Presidente,

Excmo. Sr. Presidente Honorario

Excmos. Sras. y Sres. Académicos

Señoras y Señores:

Esta Real Academia Nacional de Farmacia tiene la satisfacción de reunirse en sesión científica como homenaje al célebre químico alemán que nació en Darmstad un doce de mayo hace doscientos años. Estamos recordando a Justus von Liebig, un científico considerado como preclaro exponente dentro del patrimonio universal de las Ciencias Químico-farmacéuticas por sus amplias actividades que así lo justifican. Por lo que se sabe, ya sus inclinaciones infantiles le atraían hacia la Química, hasta el punto de que su padre le mantuvo como aprendiz de boticario.

En esta ocasión, no puedo por menos que rememorar mi primer día de clase con el Prof. Montequí, recordado Director que lo fue de esta Academia; en aquella su primera clase, al hacernos un ameno recorrido por la Historia de la Química, como tenía por costumbre, nos resaltaba ampliamente el impulso dado a la Química Farmacéutica por aquel joven profesor de Química de la Universidad de Giessen, donde ganó su cátedra a la temprana edad de veintiún años y donde estableció, por vez primera en Europa, un Laboratorio de Clases Prácticas para que sus alumnos realizaran experiencias y trabajos de laboratorio que complementarían las enseñanzas que este dinámico profesor explicaba en su cátedra. Aquello

trajo como consecuencia el que dicha Universidad fuera considerada como el primer centro de enseñanza de la Química en Europa.



FIGURA 1.- Retrato y firma de Justus von Liebig. En la edición española de su obra *Nuevas Cartas sobre la Química considerada en sus aplicaciones a la industria, a la Fisiología y a la Agricultura*, debida a Ramón Torres Muñoz y Luna. Madrid, impr. Agustín Espinosa y Cía, 1853. Pág. 2

En su quehacer diario, dentro de su laboratorio, este joven científico, ideaba muy diversos aparatos, entre ellos “un tren de combustión” para determinar cuantitativamente la composición elemental de muy diversos materiales orgánicos, según nos mencionaba con frecuencia D. Obdulio Fernández en el tiempo que estuve trabajando en su Laboratorio de Análisis de Medicamentos Orgánicos. Entre sus aparatos es destacar el diseño del singular refrigerante y su dispositivo para absorber y pesar el anhídrido carbónico procedente de los análisis por combustión de muy diversas muestras de materia orgánica. Justus von Liebig completó su formación científica trasladándose a París (1820) para trabajar con Gay-Lussac; más tarde realizaría una estancia en la Universidad de Munich, donde colaboró eficazmente con Whöler en sus famosas experiencias sobre el ácido úrico, la amigdalina y el ácido benzoico.

En su laboratorio de la Universidad de Giessen confirmó los datos que Müllder había encontrado al analizar las albúminas, aquella “materia prima vital” para las que más tarde, Berceius propondría el nombre de “proteínas” de acuerdo con su idea de que se trataba de compuestos primigenios de toda materia viva. Aquellos, sus resultados sobre las albúminas los publicó en *Annalen de Pharmacia* – revista de la que era editor- y en su libro de *Animal Chemistry*. Von Liebig descubrió el cloroformo, el cloral y varios acetaldehídos, así como los isómeros del cianato de plata. Todo lo cual le daría su relevante reputación científica como químico orgánico entre los años 1829 y 1839.

Creó y dirigió distintos laboratorios científicos y estaciones experimentales relativas a la Agricultura. Escribió muchos libros y artículos para difusión de sus resultados, así como otras diversas publicaciones relacionadas con la alimentación; entre ellas, algunas referentes a la aplicación social y al interés de la comercialización de leche artificial y de los extractos de carne. Acontecimiento, este último, por el que adquirió una gran influencia en Uruguay, hasta el punto de que surgiera una población bautizada con su apellido... la ciudad de Liebigs, que dispone de aeropuerto y donde existe un núcleo fundamental constituido por una famosa fábrica, fundada en 1861, entre los ríos Uruguay y Negro en la que se fabricaron los primeros extractos de carne

cuya marca lleva el conocido nombre de “Extractos Liebig” y, asimismo, también se preparaban y comercializaban distintos tipos de carnes congeladas.

Esta breve semblanza de tan sobresaliente científico del siglo XIX, creo que justifica el que sean varios los Miembros de esta Academia Nacional de Farmacia, reconocidos especialistas en diversos campos científicos de acuerdo con la versatilidad profesional de Justus von Liebig y le dediquen un estudio más detenido en relación con sus distintas actividades. En primer lugar, la Prof^ª. Dña. M^a Carmen Francés se encargará de exponernos algunos datos históricos sobre su influencia en la Farmacia española ; y a continuación, el Prof. D. Gaspar González resaltará la participación que tuvo este célebre científico alemán para la Agronomía del siglo XIX y también, nos informará de sus trabajos en la Química Agrícola, el Prof. Segundo Jiménez. Por otra parte, de lo que representó este científico alemán en el desarrollo de la Química Orgánica se ocupará la Prof^ª. Dña. Carmen Avendaño y de su influencia sobre la Nutrición, lo hará el Prof. D. Bernabé Sanz. Seguidamente, podremos hacernos idea de lo que representó Liebig para la Farmacia Alemana, con la participación del Prof. Dr. Wolf Dieter Müller.

Por último, el Presidente de nuestra Academia, Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol, intervendrá para clausurar esta sesión científica sobre la influencia de Justus von Liebig para la Ciencia Químico-Farmacéutica en el siglo XIX, de acuerdo con el programa previamente establecido.

Muchas gracias por la atención prestada.

Justus von Liebig: un docente en Química Orgánica y su influencia en la Farmacia Española

MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Justus von Liebig nació en Darmstadt (Alemania) en 12 de mayo de 1803 y murió en Múnich (Alemania) en 18 de abril de 1873. Liebig fue el segundo hijo de los nueve del matrimonio compuesto por Johann Georg y Maria Karoline Moserin Liebig. Su padre era un comerciante dedicado al negocio de drogas, colorantes, pinturas y productos químicos.

Liebig se casó en 1826 con Henriette Moldenhauer, que le sobrevivió, con la que tuvo cinco hijos: Georg, Hermann, que llegó a ser Colegial Correspondiente del antiguo Colegio de Farmacéuticos de Madrid, corporación antecesora de nuestra Academia (1); Agnes, Johanna y Marie (2).

I. LA PERSONALIDAD DE LIEBIG

Sus biógrafos le describen como un hombre de excelente memoria, de buen corazón, de trato amistoso y de conversación amena. Ramón Torres Muñoz y Luna, su discípulo español, decía que tenía "noble" figura y que su frente "estaba irradiando génio", dotado de "ojos penetrantes" y de "colosal talento y fecundidad científica"(3).

A Liebig se le debía haber popularizado en la segunda mitad del siglo XIX las Ciencias Químicas en relación con los demás conocimientos humanos y en particular con la medicina, la agricultura, la terapéutica y la alimentación. Pero Liebig además estaba dotado de un espíritu comercial por lo que puso en el mercado un producto dietético: el Extracto de carne Liebig, un caldo concentrado de carne de vaca "utilísimo y nutritivo para las familias y enfermos" que se anunciaba en España en la revista Blanco y Negro dando a conocer que se vendía en las principales droguerías, farmacias y casas de comestibles. El producto se identificaba porque en la etiqueta llevaba la firma de Liebig en tinta azul. La propaganda aducía que

este producto había alcanzado "las mas altas distinciones en todas las Grandes Exposiciones Internacionales" desde la celebrada en Paris en el año 1867.

II. LA FORMACIÓN QUÍMICA DE LIEBIG

Liebig , que ayudaba a su padre en el negocio familiar, se interesó tempranamente por la Química por lo que su progenitor observando esta inclinación le puso en 1819, a los 16 años, como aprendiz en la Farmacia de la localidad de Heppenheim, cerca de su ciudad natal, establecida en la Bergstrasse, dado que los farmacéuticos por entonces eran considerados unos expertos en este campo científico. Pero Liebig fue expulsado por su maestro por incompetente y de esta forma se truncó su carrera de farmacéutico (4). Al año siguiente, en 1820, su padre le envió a la Universidad de Bonn donde estudió con Karl Wilhelm Kastner, que estaba considerado como el mejor químico alemán. Trasladado éste a la universidad de Erlangen, Liebig le siguió en 1821 colaborando con él como ayudante en su laboratorio en tanto terminaba sus estudios.

En el siglo XIX la Química se enseñaba en las Oficinas de Farmacia y en los Laboratorios privados de expertos químicos siendo Francia el país en que científicos como Vauquelin, Chevreul y Gay-Lussac ofrecían una buena instrucción en esta ciencia. Además la Academia de Ciencias de Paris constituía un centro científico de primer orden donde se presentaban importantes trabajos de Química. No es extraño que Liebig consiguiera en 1822 una beca del Gran Duque de Hesse-Darmstadt para trasladarse a Paris donde consiguió ser admitido, con la ayuda de Thénard, como alumno en el laboratorio privado de Gaultier de Claubry, Profesor de Química en la Escuela de Farmacia. Más tarde, Alexander Humboldt le recomendó al célebre químico Gay-Lussac quien le enseñó a proceder de forma sistemática en sus experimentos. Entretanto el Profesor Kastner consiguió que la Universidad de Erlangen concediera a Liebig el grado de Doctor en Filosofía "in absentia" en 21 de junio de 1823 (4). Liebig reconocería que el periodo de formación que pasó en Francia constituyó la base del desarrollo y planificación de sus trabajos posteriores.

III. LIEBIG, UN DOCENTE UNIVERSITARIO

Liebig presentó los resultados de sus trabajos sobre los fulminatos en la Academia de Ciencias de París en 22 de marzo de 1824, trabajos que impresionaron de tal manera a Alexander von Humboldt que, por recomendación suya, el Gran Duque de Hesse-Darmstadt le nombró el 24 de mayo de ese año Profesor Extraordinario en la Universidad de Giessen a la temprana edad de 21 años. Su carrera como docente universitario comenzó con un recibimiento hostil por parte del claustro de profesores pero su constancia haría cambiar la opinión de estos. Un año más tarde, al morir el profesor Wilhelm Ludwig Zimmerman, Liebig pasó a ser Profesor Ordinario.

Liebig, desde su integración en la Universidad, tenía la idea de dar una enseñanza eminentemente práctica a los alumnos, motivo por el que inmediatamente instaló en unos barracones un Laboratorio universitario donde sus estudiantes podían aprender Química experimentando bajo su tutela. Tal fue el éxito de la formación que adquirirían sus estudiantes que Liebig conseguía en 1839 que la Universidad construyera un Laboratorio según su diseño.

Liebig habitaba en el mismo edificio en que estaba instalado el laboratorio. Sus alumnos recibían de él una formación práctica organizada y sistemática pues primeramente eran instruidos en Química Analítica, realizando análisis cualitativos y cuantitativos, después pasaban a ser formados en Química Orgánica, preparando compuestos orgánicos, y finalmente llevaban a cabo investigaciones especiales, resolviendo problemas sugeridos por Liebig. Éste todas las mañanas se informaba de los trabajos que habían realizado los estudiantes, discutía los progresos de sus investigaciones y planificaba el trabajo futuro que habían de realizar.

Una de las más grandes contribuciones de Liebig a la Química fue como Profesor ya que tuvo el talento de fundar en la Universidad de Giessen un auténtico Laboratorio científico donde estableció un sistema docente metódico que sirvió como modelo para todos los Laboratorios de enseñanza universitaria en su época. Liebig diseñó métodos operatorios y aparatos nuevos para realizar investigación química y cuyo uso se extendió

en el mundo entero.

Así el Procedimiento Liebig para análisis elemental orgánico en el que utilizaba los aparatos de desecación y de combustión que llevan su nombre constando éste último de un tubo de combustión, otro de cloruro de calcio y el famoso aparato de bolas que serían reproducidos en los Tratados de Química Orgánica hasta fin del siglo XIX.

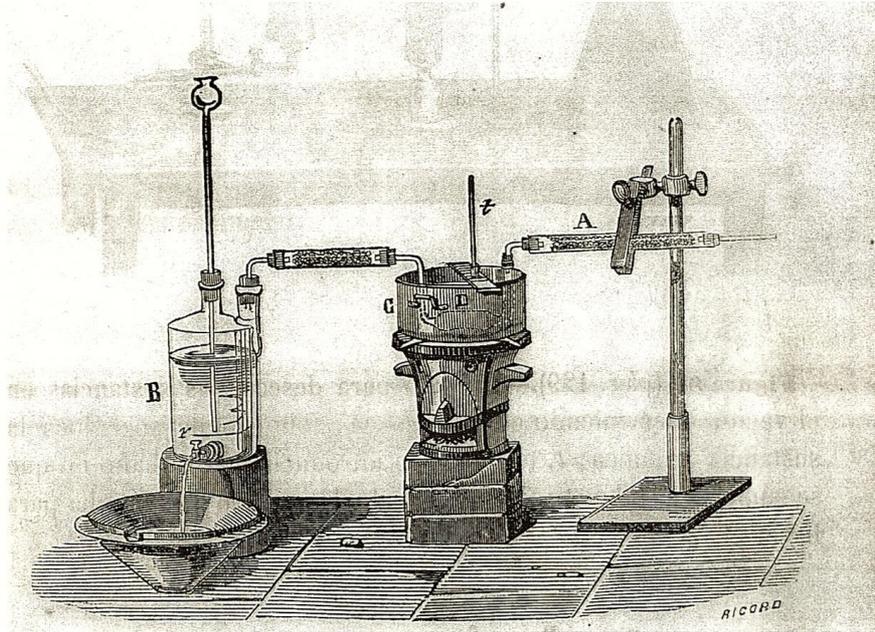


FIGURA 2.- Aparato de desecación, paso preliminar para el análisis elemental orgánico, según diseño del farmacéutico Eduardo Ricord Puerta. En la obra de Gabriel de la Puerta *Química Orgánica General y Aplicada a la Farmacia, Medicina, Industria, Agricultura y Artes*. Tomo I. Madrid, Tip. De T. Fortanet, 1868. Fig. 8. Pág. 129

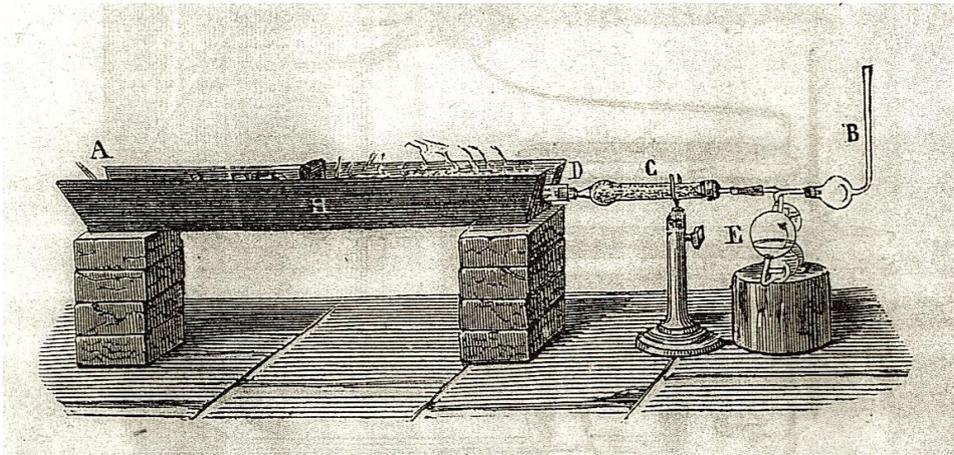
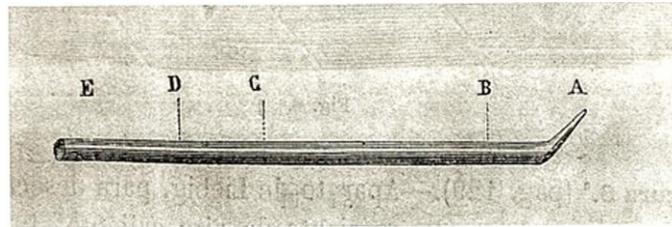
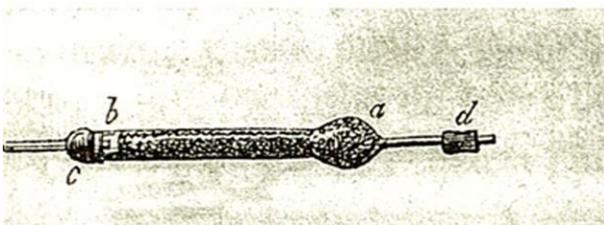


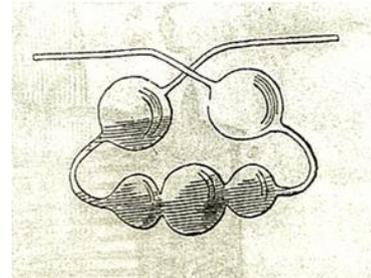
FIGURA 3.- Aparato de combustión para efectuar el análisis elemental orgánico en el que tres partes que lo componen se montan en la disposición indicada, colocando el tubo de combustión en el hornillo (H). En la obra de Gabriel de la Puerta citada .Fig. 13, pág. 135; Fig. 10, 11 y 12, pág. 130-131



Tubo de combustión



Tubo de cloruro cálcico



Tubo o aparato de bolas

La fama de la enseñanza en Química dada por Liebig atrajo no sólo a los estudiantes alemanes sino que comenzaron a llegar a la Universidad de Giessen estudiantes de diversas partes del mundo produciéndose un desplazamiento de la preponderancia de la enseñanza de la Química de Francia a Alemania.

Entre los discípulos de Liebig se contaron excelentes químicos así en Alemania: Hoffmann, Fresenius, Pettenkofer, Kopp, Fehling, Volhard, Will, Warrentrapp, Erlenmeyer, Strecker y Kekulé; en Dinamarca: Henneberg; en Francia: Wurtz, Regnault, Gerhardt; en Gran Bretaña: Williamson, Playfair y Muspratt; en Estados Unidos: Horsford, Wolcott Gibbs y Lawrence Smith (5).

Liebig en 1852, tras haberse dedicado a la enseñanza de la Química en la Universidad de Giessen durante 28 años, se trasladó a la Universidad de Múnich donde sucedió al profesor Heinrich August Vogel. Liebig contaba 49 años cuando recibió la oferta para enseñar en esta Universidad y le pareció atractiva puesto que le preocupaba su salud y aceptó con la condición de no encargarse de la instrucción en el laboratorio puesto que esta actividad le requería emplear muchas de sus energías. Liebig ejerció su actividad docente en la Universidad de Múnich durante 20 años dedicándose además a impartir conferencias en las que utilizaba un lenguaje sencillo y un estilo claro por lo que contribuyó a la difusión de los conocimientos de Química tanto entre la burguesía como entre la nobleza.

La labor educativa desarrollada por Liebig fue de tanta importancia que la Universidad de Giessen lleva hoy su nombre y en la ciudad de Giessen una calle le ha sido dedicada y en ella abre sus puertas el Museo Liebig, que está a cargo de la Sociedad Justus Liebig, y es uno de los Museos de Química más importantes del mundo donde se puede contemplar el instrumental de laboratorio original empleado en la época de Liebig. No es extraño que este año 2003 en que se cumple el bicentenario del nacimiento de este célebre químico alemán haya sido declarado en Alemania como el Año Liebig y el Año de la Química Orgánica y que se le estén dedicando actos especiales en su memoria no sólo en su tierra natal sino también en diversas partes del mundo.

IV. INFLUENCIA DE LIEBIG EN ESPAÑA

Muchas de las publicaciones de Liebig fueron vertidas al español no desde el alemán sino desde las traducciones realizadas al idioma francés por algunos de sus discípulos, en particular por Gerhardt. Habiéndose convertido Alemania en el centro científico de la Química y en el país en que más libros y revistas se publicaban sobre esta materia, en España tanto profesores como alumnos carecían del conocimiento del idioma alemán y por lo tanto no tenían acceso a aquéllas publicaciones lo que reconocía el Profesor José Casares Gil incluso en 1905 (6).

Traductores de diferentes obras de Liebig fueron algunos españoles, así en 1845, el médico Manuel José de Porto, Catedrático de Fisiología en la Facultad de Ciencias Médicas de Cádiz, publicó la obra titulada "*Química Orgánica aplicada a la Fisiología Animal y a la Patología*" en cuyo prólogo comenta que una obra como esta "hace tiempo faltaba para la enseñanza de las ciencias médicas"(7). Ese mismo año el farmacéutico Juan José Villar y Macías edita en Salamanca "*Cartas sobre la Química y sobre sus aplicaciones à la industria, à la Fisiología y à la Agricultura*", obra que Liebig había escrito "para personas instruidas...(y)...para los lectores, que no gustan del estilo llamado popular, en que con frecuencia se da lugar a explicaciones triviales y simples"(8). No cabe duda que esta publicación le serviría de mérito para ser nombrado Regente de Química en la Universidad de Salamanca en 7 de agosto de 1846 y más tarde, por Real Orden de 27 de abril de 1847, Catedrático de Química de la Facultad de Ciencias de esa Universidad, plaza de la que tomó posesión en 20 de mayo de ese año (9) y desde la que difundiría las teorías químicas de Liebig. Años más tarde, Juan José Villar calificaba a Liebig como "uno de los más eminentes químicos de nuestro siglo"(10).

En 1850, se publicaban en Barcelona las "*Cartas Químicas*" de Liebig por los Profesores de la Universidad de Barcelona: Antonio Bergues, Catedrático de Lengua griega, Miguel Guitart y Buch, Regente de Medicina y Profesor de Historia Natural, Juan Roig, Profesor de Lenguas vivas, y el abogado Ignacio Godás. En el Prólogo, fechado en julio de 1844, Liebig exponía que el objeto de estas cartas era llamar la atención de los hombres ilustrados "hacia el estado y la importancia de la química...en los progresos

de la industria, de la mecánica, de la física, de la agricultura y de la fisiología" (11).

Entre los admiradores de la obra de Liebig en España, y uno de sus más fervientes discípulos se encontraba el farmacéutico Ramón Torres Muñoz y Luna quien se formó con el químico alemán en 1851, junto con Mariano Echevarría, también farmacéutico (12).

El Dr Torres, al año siguiente se entrevistó con Liebig en la ciudad de Giessen el día 25 de mayo, a quien consideraba como "genio de la química orgánica, estrella polar de su entusiasmo científico". Ramón Torres era Catedrático de Ampliación de Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Madrid y más tarde obtuvo la Cátedra de Química General de esa Facultad.

En 1853 publicaba *Nuevas Cartas sobre la Química considerada en sus aplicaciones a la industria, a la Fisiología y a la Agricultura*", traducción dedicada al Barón Liebig en 1 de enero de ese año y en la que se declaraba su "más apasionado discípulo y admirador"(13). En ese mismo año veía la luz la obra titulada "*La Urinometría*"(14), folleto que reproducía la lección que pronunció en la Cátedra de Química de San Isidro el día 1 de julio de ese año y en el que daba a conocer el método establecido por Liebig para analizar la orina y los resultados que se obtenían tanto en hombres sanos como enfermos (15). Tres años más tarde publicaba "*La Química en sus principales aplicaciones a la Agricultura*" que incluía como complemento varias cartas de Liebig relativas a este tema (16) y en su "*Tratado de Química General*" que alcanzó cinco ediciones (1861, 1864, 1872, 1877 y 1885) (17) y que estaba destinado a los alumnos de Ciencias, Medicina, Farmacia, Ingenieros Industriales, Agrónomos, Ingenieros de Minas, etc...; efectuaba una serie de consideraciones sobre la importancia de la Química como fuente de riqueza pública aludiendo a Liebig porque comparaba "la economía del cuerpo humano con la del cuerpo social"(18).

IV.1. INFLUENCIA DE LIEBIG EN LA FARMACIA ESPAÑOLA

Desde 1845 en que, por Real Decreto de 17 de septiembre, se establecía el Plan de Estudios para las Facultades de Farmacia y gracias al

eminente farmacéutico Antonio Moreno Ruíz, que desde 1843 era Consejero de Instrucción Pública y por tanto encargado de elaborarle y que para ello consultó en 1844 con el también farmacéutico Manuel Rioz y Pedraja, que por entonces era Catedrático de la Facultad de Ciencias Médicas en la Universidad de Cádiz; y "por su consejo figuró por primera vez la cátedra de Química Orgánica en la enseñanza en España" (19). El Dr. Manuel Rioz y Pedraja fue nombrado Catedrático de esta materia en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid por Real Orden de 28 de septiembre de 1845 (20), asignatura que enseñó durante 20 años inspirándose en las obras de Liebig (21), en concreto en el "*Tratado de Química Orgánica*", por lo que fue el propagador de la Química Orgánica en España formándose con él muchos farmacéuticos y muchos profesores de esta materia (22).

Esta obra de Liebig fue utilizada como libro de texto en las Facultades de Farmacia españolas en virtud de las Reales Ordenes de 15 de septiembre de 1852 y de 22 de septiembre de 1867 (23).

Se empleaba en aquellos años la versión española de la traducción francesa realizada por Carlos Gerhardt, Profesor de Química en la Facultad de Ciencias de Montpellier. Esta versión fue realizada en 1847 por los farmacéuticos Rafael Sáez Palacios y Carlos Ferrari Scardini, farmacéuticos mayor y segundo de los Hospitales Generales y Sáez además era Regente agregado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid. Los dos primeros tomos vieron la luz ese año mientras que el tercero y cuarto salieron de imprenta al año siguiente (24). Liebig ya indicaba en el prólogo de su libro, fechado en 10 de abril de 1840, que se trataba de una obra destinada a la enseñanza que había de ser entendida no como un tratado completo sino mas bien como "el ensayo de un nuevo sistema de química orgánica".

Pero los farmacéuticos españoles dedicados a la enseñanza de la Química Orgánica comenzaron a publicar sus propias obras sobre esta materia y a ser éstas utilizadas como libros de texto. Así Gabriel de la Puerta Ródenas y Magaña, que ganó en 1866 por oposición una plaza de Catedrático Supernumerario en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid, explicaba la asignatura Farmacia Químico-Orgánica y

consciente de la falta de libros sobre esta materia publicó el titulado "*Química Orgánica General y Aplicada à la Farmacia, Medicina, Industria, Agricultura y Artes*" en dos tomos, que vieron la luz en 1868 y 1869, y en la que exponía la importancia de la Química Orgánica porque "conduce a la investigación de los sublimes secretos de la naturaleza viviente" y porque el número de sus aplicaciones era considerable (25). La obra tuvo muy buena acogida y fue utilizada para la enseñanza en todas las Facultades de Farmacia de España como libro de texto por lo que el autor decidió hacer una segunda edición que constó de dos tomos y que bajo el título "*Tratado de Química Orgánica general y aplicada a la Farmacia, Industria y Agricultura con un Tratado de Química Biológica vegetal y animal*" se publicó en 1879 (26).

Gabriel de la Puerta había utilizado como obra de consulta el "*Tratado de Química Orgánica*" de Liebig y reproducía algunos de los procedimientos y aparatos ideados por el químico alemán. Asimismo Julián Casaña y Leonardo, Catedrático de Farmacia Químico-Orgánica en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona de 1860 a 1896, consideraba en 1865 que para la enseñanza de la Química Orgánica era "complemento absolutamente indispensable...un extenso sistema de trabajos de laboratorio que permite á los alumnos ir comprobando por sí mismos la verdad de las doctrinas que se les expliquen, las ventajas é inconvenientes de los diversos métodos operatorios y la pureza de los productos elaborados" (27). Más tarde publicaba un "*Tratado de Química Orgánica aplicada a la Farmacia y de Farmacología Químico-Orgánica*" en el que había utilizado como obra de consulta el Tratado de Liebig mencionado anteriormente. La obra constaba de dos tomos que salieron de imprenta en 1870 y 1873 respectivamente y que tuvo una segunda edición en 1877-1879 (28). Casaña reconocía en el prólogo haber sido discípulo de Manuel Ríoz y Pedraja que fue quien le indujo a tener "una inclinación especial a los estudios de química orgánica" y agradece a los farmacéuticos, a los industriales y "à los señores catedráticos de química orgánica que la han recomendado" como libro de texto (29) y cita al Catedrático de Farmacia Químico-Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid, D. Santiago Olózaga y Fondrain (1866-1880).

En la Universidad de Granada, también D. Bonifacio Velasco y

Pano, Catedrático de Farmacia Químico-Orgánica de 1863 a 1878, publicaba en 1872-1873 en dos tomos su obra titulada "*Tratado de Química Orgánica aplicada a la Farmacia y à la Medicina*" en cuyo prólogo, fechado el 15 de septiembre de 1872, elogiaba el "*Tratado de Química Orgánica*" de Liebig porque dice "ha alcanzado entre los sabios la mas brillante acogida...por la claridad y sencillez en el desenvolvimiento de sus ideas" llegando sus estudios a formar un cuerpo de doctrina que hicieron de Alemania la cuna del movimiento científico señalando que la escuela de Liebig ha echado "hondas raíces" en España gracias a los docentes universitarios y que a él le ha movido a escribir esta obra la "carencia de obras de estudio y de consulta traducidas a nuestra lengua". Con esta obra ha llenado ese vacío y ha facilitado a los alumnos "el escabroso camino de la ciencia" (30). Pero el Dr. Bonifacio Velasco en el Discurso inaugural del Curso Académico 1870-1871 que pronunció en la Universidad de Granada definía a Liebig como "el más sabio de los químicos alemanes" y recomendaba la enseñanza práctica de la Química porque "solo así es como se pueden comprender las teorías explanadas por el Profesor en sus abstractas explicaciones, y sacar de ellas óptimos frutos" y reprochaba al Gobierno y a la sociedad española que no hubieran considerado a los químicos como hombres científicos sino como "una planta exótica en el terreno de la ciencia" (31).

El Plan de estudios, establecido por Real Decreto de 24 de septiembre de 1886, fomentaba el desarrollo de la Química Orgánica experimental y práctica. José Rodríguez Carracido en el Discurso inaugural del Curso Académico 1887-1888 en la Universidad Central de Madrid, en el que trataba del "*Estado de la enseñanza de las Ciencias Experimentales en España*", consideraba indispensable que los alumnos trabajasen en los laboratorios (32) y en su "*Tratado de Química Orgánica teórico y práctico aplicado especialmente à las Ciencias Médicas*" (33) aparecen descritos los procedimientos y aparatos de Liebig empleados en el laboratorio para la investigación de sustancias orgánicas. Esta obra se siguió como libro de texto en sus explicaciones de Química Orgánica desde su Cátedra en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid (1880-1897) y con ella se formaron numerosos alumnos a finales del siglo XIX, obra que se consideraba "insustituible para preparar a todo el que pretendía trabajar

en un laboratorio de Química Orgánica" (34).

Las enseñanzas prácticas estuvieron dirigidas desde 1896 por el Ayudante Francisco Agustín Murúa y Valerdi, que se había formado en Alemania. En el laboratorio los alumnos se educaban científicamente, al estilo de Liebig, realizando operaciones de investigación, se les exigía describir detalladamente los fenómenos observados y los resultados obtenidos debiendo hacer una crítica razonada del procedimiento seguido en la obtención del producto. En el momento en que D. Baldomero Bonet y Bonet, Catedrático de la asignatura en la Universidad de Barcelona (1897-1899) y autor de la obra "*Elementos de Química Orgánica aplicada a la Farmacia*" (Barcelona, impr. Pedro Ortega, 1899) ocupó la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid, por Real Orden de 8 de julio de 1899, publicó con Francisco Agustín Murúa los trabajos experimentales que llevaron a cabo tanto los alumnos de Licenciatura como los de Doctorado bajo el título: "*Laboratorio de Química Orgánica*" durante los cursos de 1899 a 1900 y 1900 a 1901 (35).

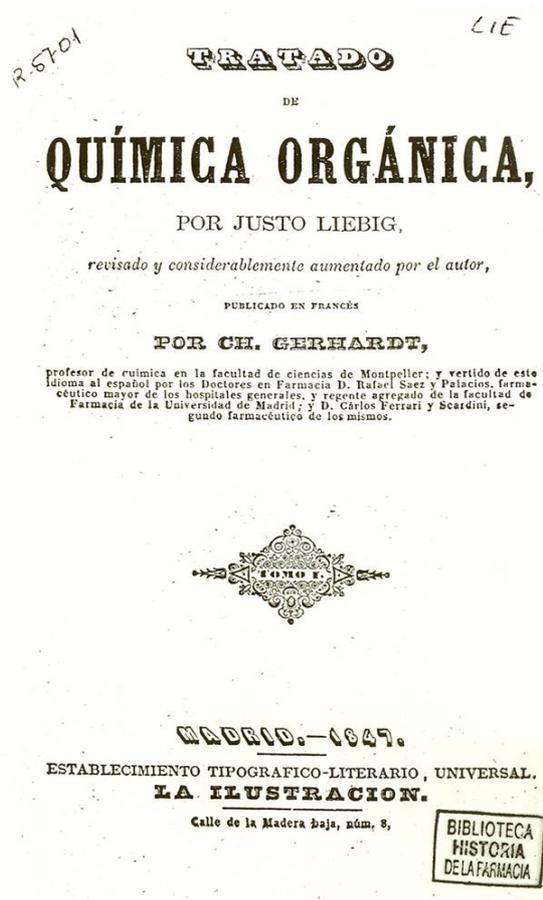


FIGURA 4

La publicación comprendía la descripción del producto orgánico (fórmula, sinonimia, propiedades y usos en Medicina, Farmacia e Industria) y el procedimiento seguido en su obtención (fundamento teórico, práctica de la operación, crítica y reconocimiento).

Entre los primeros alumnos formados en la práctica experimental se encontraba Obdulio Fernández Rodríguez quien obtuvo en 1908 la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de Granada y en 1914 la

Cátedra de Análisis de Medicamentos Orgánicos en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid (36).

CONCLUSIÓN

- 1^a.- La divulgación de las ideas de Liebig en España se debe, entre otros, a farmacéuticos siendo su mayor propagador Ramón Torres Muñoz y Luna.
- 2^a.- El farmacéutico Manuel Rioz y Pedraja influyó decisivamente para que la Química Orgánica se introdujera en el curriculum del farmacéutico español.
- 3^a.- Si en las Facultades de Farmacia españolas, creadas en 1845, se utilizó como libro de texto durante veinte años el "*Tratado de Química Orgánica*", de Liebig , en la versión española de los farmacéuticos Rafael Sáez Palacios y Carlos Ferrari Scardini; posteriormente se emplearon las obras publicadas por los Profesores españoles, farmacéuticos, que impartían esa materia.
- 4^a.- La adopción del método experimental de Liebig en la enseñanza práctica de Química Orgánica, en los laboratorios de las Facultades de Farmacia españolas, no se impuso hasta finales del siglo XIX gracias al Plan de Estudios de 1886 y en este sentido fue destacable la labor realizada por los Profesores Baldomero Bonet y Bonet y Francisco Agustín Murúa y Valerdi en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Colegial nº 815, residente en Múnich. COLEGIO DE FARMACÉUTICOS DE MADRID (1870) *Lista General de los individuos que han sido admitidos en esta Corporación*. Madrid, impr. Gregorio Juste. Pág. 17
- (2) HOLMES, F.L. (1981) Biography of Justus von Liebig. En *Dictionary of Scientific Biography*. Coord. Charles Coulston Gillispie. New York, Charles Scribner's Sons, 8ª ed. Vol. 8. Pág. 329-350
- (3) TORRES MUÑOZ DE LUNA, R. (1877) *Elementos de Química General*. Madrid, impr. Vda e hijas de A. Peñuelas. Pág. 24-26
- (4) LOCKEMAN, G. (1960) *The story of Chemistry*. London, Peter Owen Ltd. Pág. 162
- (5) IHDE, A.J. (1964) *The development of modern Chemistry*. New York, Harper and Row. Pág. 261-262
- (6) TOMÁS Y GARRIDO, G.Mª (1974) *Historia de la Facultad de Farmacia de Madrid (1845-1945). Contribución a su estudio*. Tesis Doctoral. Madrid, Pág. 398-400
- (7) LIEBIG, J. (1845) *Química Orgánica aplicada a la Fisiología animal y a la Patología*. Trad. por Manuel José de Porto. Cádiz, Lit. Sociedad de la Revista Médica. Prólogo, V.
- (8) LIEBIG, J. (1845) *Cartas sobre la Química y sobre sus aplicaciones a la industria, a la Fisiología y a la Agricultura*. Trad. por José Villar y Macías. Prólogo
- (9) ROLDÁN Y GUERRERO, R. (1976) Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Tomo IV. Madrid, I.M.P.H.O.E. Pág. 715-718
- (10) VILLAR Y MACIAS, J. (1885) De la Nutrición animal. *La Farmacia Española* XVII, 20: 311
- (11) BERGUES DE LAS CASAS, A. Y COL. (1850) *Germania, ó Colección de los Sumos Escritores de Alemania*. Barcelona, impr. A. Frexas. Pág. 6
- (12) TORRES MUÑOZ DE LUNA, R. (1873) Biografía del Barón de Liebig II. *La Farmacia Española* V,20: 271-273
- (13) LIEBIG, J. (1853) *Nuevas Cartas sobre la Química considerada en sus aplicaciones a la industria, a la Fisiología y a la Agricultura*. Trad. por Ramón Torres Muñoz y Luna. Madrid, impr. Agustín Espinosa y Cia. Pág 3-4
- (14) ROLDAN Y GUERRERO, R. Loc. cit. en 9. Pág. 604
- (15) PALAU Y DULCET, A. (1971) *Manual del Librero Hispanoamericano*. Tomo XXIII. Barcelona, Antonio Palau y Dulcet. Pág. 433-434. N° 337067

- (16) ROLDAN GUERRERO, R. Loc. Cit. en 9. Pág. 605
- (17) PALAU Y DULCET, A. Opus cit. en 15. Pág. 433, N^o 337073 a 337077
- (18) TORRES MUÑOZ DE LUNA, R. (1877) *Elementos de Química General*, 4^a ed. Madrid, impr. Vda e Hijas de A. Peñuelas. Pág. 9
- (19) TOMÁS Y GARRIDO, G.M^a Opus cit. Pág. 352
- (20) Ibidem. Pág. 109
- (21) ROLDÁN Y GUERRERO, R. Loc. cit. 9. Pág. 262
- (22) CONTRERAS MOLINA, M^a C. (1997) *Estudios Universitarios de Farmacia: siglos XIX y XX*. Tesis Doctoral. Granada. Pág. 131
- (23) Ibidem. Pág. 175-229
- (24) LIEBIG, J. (1847-1848) *Tratado de Química Orgánica*. Trad. por Rafael Sáez Palacios y Carlos Ferrari Scardini. Tomo I,II y IV. Est. tip. La Ilustración. Tomo III, impr. del Diccionario geográfico
- (25) Tomo I. Madrid, Est. tip. de T. Fortanet. Pág. 2
- (26) Madrid, Moya y Plaza edit.
- (27) CASAÑA Y LEONARDO, J. (1865) *Apuntes para la reforma de la enseñanza de la Facultad de Farmacia*. Madrid, impr. José M. Ducazcal. Pág. 64
- (28) 1^a ed. Madrid, impr. Bailly-Bailliére y 2^a ed. Barcelona, impr. Jaime Jepús Rovialta
- (29) Prólogo 2^a ed. VIII-IX.
- (30) Granada, impr. de Indalecio Ventura. II, IV y V.
- (31) *El Restaurador Farmacéutico* (1870) XXVI, 51: 804-805
- (32) TOMÁS Y GARRIDO, G. M^a (Opus cit. Pág. 402-404
- (33) Madrid, ed. Juan Muñoz Sánchez, 1882, 1888, 1890, 1910
- (34) CONTRERAS MOLINA, M^a C. Opus cit. Pág. 327-328
- (35) Madrid, Tipolit. J. Corrales, 1901 y 1902
- (36) ROLDÁN Y GUERRERO, R. (1975) Opus cit. Madrid, I.M.P.H.O.E. Tomo II. Pág. 176

Liebig: un hito en la Agronomía del siglo XIX

GASPAR GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

Ante la deferente invitación de la Junta Rectora de esta Real Academia a participar en este acto, conocedor de las contribuciones de los académicos Dras. Francés y Avendaño y Drs. Jiménez y Sanz, sobre aspectos tan concretos de la actividad creadora de Justus von Liebig como la docencia, la química orgánica, la nutrición y la integración de conocimientos en química, y a las que sin duda harán brillantes aportaciones, pensé que bien podía ocuparme de las realizadas por el mismo a la agronomía, bien sabedor, – por lo que a continuación diré– de que no se puede tratar esta tecnología sin hacer inmediatamente mención a la química con que a veces –erróneamente– se identifica, y en la que Liebig basó sus aportaciones.

He de especificar, asimismo, que al distinguirlo como “hito de la agronomía” he querido destacar su faceta más trascendente: la de haber dado contenido real a este término, concretando las leyes que rigen la agricultura. Porque de hecho las palabras “agronomía” y “agrónomo” ya venían siendo utilizadas por tratadistas españoles, con el significado general de agricultura: por ejemplo “... conocimientos necesarios para gobernar haciendas de campo” (Charro Lorenzana, 1871) o para “divulgar los conocimientos agrarios entre los agricultores” (Hidalgo de Tablada, 1851). Con esto pretendo, asimismo, justificar la cita de Poincaré que encabeza mi intervención, porque últimamente se ha tendido y se sigue tendiendo a tratar la agronomía como una ciencia aplicada, cuando en realidad, se trata de una de las múltiples aplicaciones de la Ciencia como paladinamente la define la RAE “Conjunto de conocimientos aplicables al cultivo de la tierra, derivados de las ciencias exactas, físicas y económicas”. Así pues, la agronomía no es una ciencia aplicada, ni siquiera una “ciencia de síntesis”. Es, una **tecnología**,

es decir, una selección de conocimientos aportados por numerosas ciencias fundamentales o básicas (véanse los planes de estudio de las Escuelas técnicas medias y superiores de ingenieros técnicos y agrónomos desde su fundación) que, eso sí, con una metodología propia, – por ejemplo, los experimentos en campo abierto diseñados por Boussingault–, se traduce en muy diversas técnicas agrarias. Es, a este nivel práctico, cuando el técnico y el práctico se ven obligado a realizar una síntesis de saberes.

Sin embargo, los intentos de individualizar la agronomía como ciencia vienen ya de antiguo, se han basado en reafirmar la singularidad del “hecho agrario”. Aún hoy día en el reciente informe sobre “La investigación Agraria en España” (Lostao 2003), se insiste machaconamente en este hecho diferencial aunque no deja de reconocerse que, en esencia, la agronomía no es más que una síntesis de ciencias. Pues ni siquiera considerando su papel vital de producir alimentos –también la pesca y la caza lo suministran e incluso la química y la bioquímica (fermentaciones)– se puede justificar como una ciencia más, aunque si se individualice la investigación agronómica en razón de los fines y los medios. Ciertamente los conocimientos básicos: matemáticas, física, química, biología, economía, etc. se aplican a la agricultura como a otras muchas tecnologías.

Esta disquisición no es baladí, como a primera vista pudiera parecer, pues la “individualización” de la agronomía y consiguiente aislamiento del avance del conocimiento científico, fue en gran medida responsable del atraso de la agricultura durante todo el siglo XIX y gran parte del siglo XX. Efectivamente, en términos generales la actividad agraria no constituyó una tecnología avanzada hasta que el interés de los científicos, principalmente químicos y biólogos, se centró en hallar una explicación de los fenómenos responsables de la misma, y confluyó con los saberes prácticos adquiridos a lo largo de milenios liberándolos de mitos, magia y supersticiones. Y fueron precisamente Justus von Liebig, el primero en autodenominarse químico, máximo exponente de la agronomía en el siglo XIX, aplicando la química a los problemas de la fisiología y nutrición vegetal y animal; y Gregor Mendel, fraile benedictino dedicado a la biología vegetal, asentando las bases

genéticas de la mejora de los seres vivos, vegetales y animales, quienes con sus decisivas aportaciones en dos ciencias matrices a mediados del siglo XIX, los científicos que más han contribuido a perfeccionar la agricultura y, con ello a paliar el hambre de la humanidad.

2. ANTECEDENTES DE LAS APORTACIONES DE LIEBIG

A principios del siglo XIX, se contaba, por supuesto, con la experiencia acumulada por los agricultores desde los inicios de su actividad hace unos diez mil años, cuando se asentó en el neolítico y el hombre pasó de recolectar y cazador a cultivador y ganadero. Este saber práctico inicial, unido a mitos y relaciones mágicas o cósmicas, con el tiempo se empieza a concretar en normas o preceptos que se transmiten para resolver casos prácticos, primero por vía oral, más tarde en documentos y material gráfico diverso (planchas de arcilla, papiros, pergaminos, etc.). De este modo nos han sido legados los conocimientos de los pueblos primitivos; por ejemplo, de la civilización Akadia en la loseta que se conserva en el Museo Británico, de los egipcios, con los dibujos e inscripciones del “*Libro de los muertos*”; de los hebreos en el “*Deuteronomio*” entre los griegos, Hesiodo en “*Los Trabajos y los Días*”, no solo se elogia la agricultura, sino que da consejos sobre ella y ofrece normas a los labradores para que se preserven de la miseria de las deudas. Asimismo los romanos disponían de una extensa bibliografía con los conocimientos de los griegos y cartagineses. Entre sus autores más notables están los llamados geopónicos: Catón; Varron y el gaditano Colmuela quien cita a más de veinte autores entre los primeros y muy especialmente al cartaginés Magon. Esta bibliografía fue condensada en un volumen por Petrus Crecentius alrededor del año 1240: “*Ruralium commodorum libri duodecim*”. Es la etapa **principalista o formulista**, también **vitalista** por apelar a la existencia de un principio distinto de la materia, ajeno a las leyes físicas, en la explicación de los fenómenos biológicos.

Al lado de esto, los filósofos griegos, sobre todo Aristóteles, comienzan a aplicar la lógica formal a la explicación de los referidos fenómenos y este conocimiento más o menos informado por la citada experiencia, el mito, la magia y las supersticiones, persiste durante muchos años, llevando a **la etapa empírica** de los saberes agrarios. Se formulaban teorías sobre el crecimiento de las plantas y los animales, basadas en la experiencia, cuando no en ensayos cuya interpretación se falseaba por la falta, de un conocimiento profundo de los fenómenos. Dentro de esta etapa, dos fueron en líneas generales los antecedentes a las aportaciones de Liebig: la búsqueda del llamado “principio o fundamento de vegetación”, y las indagaciones en torno a “los nutrientes de las plantas”. (Russell, 1968).

2.1 LA BÚSQUEDA DEL PRINCIPIO DE VEGETACIÓN. EL AGUA Y LA TEORÍA DEL HUMUS

Ya a mediados del siglo XVI empezó a cundir la preocupación por hallar el “fundamento o principio de vegetación” como causa de la fertilidad del suelo, atribuyéndola de modo único o simultáneo al agua, a la materia orgánica, y a principios minerales, cuando no al aire... la temprana observación de que las deyecciones animales, los vegetales y cuerpos animales y otros residuos orgánicos descompuestos aumentaban la fertilidad del suelo, tardó mucho en tenerse en cuenta, por los estudios de dicho siglo e incluso posteriores. Francis Bacon (1561-1626) creía que el agua constituía el principal alimento de las plantas, siendo función del suelo mantenerlas enhiestas y protegerlas de los excesos de calor o frío, aunque afirmaba, asimismo, que cada planta extraía del suelo, además de agua, un jugo particular para su crecimiento empobreciéndolo para la misma. Van Helmont en 1652, basándose en el resultado –mal interpretado– de experimentos en tiestos con plantas de sauce afirmó también que el agua era el único alimento de las plantas, desestimando el papel desempeñado por la atmósfera y por las pequeñas cantidades de suelo que notó faltaban al pesar los tiestos utilizados en sus ensayos. De nuevo, Robert Boyle en 1661 se afianzaba en el papel

fundamental del agua, aseverando que la sal, espíritu, tierra y aún aceite podían proceder de aquella.

Sin embargo, los atisbos de lo que sucedía en la realidad se encuentran en Bernard Palissy quien ya en 1573 escribía: “*cuando los agricultores queman la paja sobrante sobre el suelo aumentan la fertilidad porque en las cenizas va la sal que previamente tomaron del mismo*”... “*el estiércol no sirve más que por la sal que dejan la paja y el heno al pudrirse*”.

Casi un siglo después, en 1656, el farmacéutico Glauberg sentó la hipótesis de que el **nitro** era el “principio de vegetación”, porque los notables incrementos de los rendimientos que provocaba la adición al suelo de la tierra recogida de establos que lo contenían, tenía que proceder necesariamente de la orina o deyecciones sólidas del ganado y estar en las plantas consumidas como alimento por el mismo. Esta hipótesis fue demostrada por John Mayow en 1674, al confirmar mediante experimentos que las cantidades de salitre del suelo eran máximas cuando las plantas comienzan a crecer en primavera, mientras que desaparecen con el posterior desarrollo vigoroso porque todo el nitro es absorbido por las mismas. Pese a esto, todavía en 1727 Boerhaave enseñaba que las plantas absorben los jugos de la tierra y después los convierten en alimento; “La materia prima, el **jugó radical primario**, de los vegetales, decía es un compuesto de todos los tres reinos, es decir, de cuerpos fósiles y partes purificadas de animales y vegetales”, a lo que considera como el *quilo* de la planta, encontrándose principalmente con el primer orden de vasos, es decir, en las raíces y el cuerpo de la planta que corresponde al estómago y a los intestinos del animal. Poco después, en 1741 Kúlbél, sostenía que el principio de vegetación era un “*magma unguinosum*” obtenible del humus, sentando un precedente de lo que más tarde se conocería como *teoría del humus*, desarrollada por Wallerius, profesor de química en Uppsala (Suecia) (Russell, 1968).

La situación al finalizar este periodo Jethro Tull, un sobresaliente agricultor de Oxford que introdujo la sembradora en líneas y la binadora de tracción animal (caballo)– además de sostener que el laboreo y los abonos orgánicos (“nitro”) evitan la “fatiga” del suelo y soslayan el barbecho, de

introducir la alternancia de cultivos y la siembra en bandas y el laboreo entre líneas– estableció tres principios que se aceptaron por los tratadistas agrarios de aquel tiempo: 1. Todas las plantas se nutren del mismo tipo de alimento. 2. Ninguna planta compite directamente por el alimento con otra que esté próxima. 3. Si dado el tipo de alimento que suministra un suelo se ha adaptado bien a un cultivo, siempre estará adaptado a ese mismo cultivo (Argemesi, 1988). Y también que los siguientes materiales contribuyen de alguna manera al crecimiento de las plantas, aunque se discute cual de ellos es el que verdaderamente forma el crecimiento o alimento: 1º nitro; 2º agua; 3º aire; 4º fuego (calor) y 5º tierra. (Russell, 1968).

2.2 LA BÚSQUEDA DE LOS PRINCIPIOS NUTRITIVOS DE LAS PLANTAS

Russell (1968) distingue en esta etapa dos periodos previos a las aportaciones de Liebig: el periodo flogístico (1750-1800), en el que se aplica la teoría del médico Sthal y el periodo moderno con las bases de la fisiología vegetal y lo que denomina “fundamentación de la ciencia agrícola”. En el primero sitúa los escritos de Francis Home (1757) en los que plantea hasta qué punto podría la química establecer los fundamentos de la agricultura y llega a la conclusión de que el alimento vegetal no es una cosa singular sino varias, y enumera seis: aire, agua, tierra, sales de diferentes clases, aceite y fuego en un estado fijo. Como prueba última aduce que “todos los vegetales y sus jugos rinden aquellos verdaderos principios y no otros mediante todos los experimentos químicos que hasta la fecha se han hecho sobre ellos con o sin fuego”. Pero Home además de reconocer que la nutrición vegetal depende de varios factores, indica con claridad los dos métodos a seguir para estudiar el problema: cultivos en tiestos y análisis de la planta.

Woodward en 1699, después de analizar los citados trabajos de van Helmont concluye que no era el agua, sino la sustancia térrea que contenía la que constituía los vegetales, bien mediante uso directo de abonos o dejando el terreno en barbecho para que la lluvia los restituyese al suelo, anticipando

de este modo el **principio de la restitución**. Wallerius, después de analizar plantas para descubrir los materiales de que vivían, concluía en 1761 que el humus es la fuente adecuada de alimento – *la nutritiva*–, mientras que los otros constituyentes del suelo son *instrumentalia*. (*Nutritio non fieri potest a rebus heterogenis sed homogeneis*: “La nutrición no puede realizarse a base de cosas heterogéneas, sino homogéneas”. De este modo se consolida la teoría del humus.

Sin embargo, Carl Wilhelm Scheele, boticario sueco que además de sus muchos descubrimientos de elementos químicos, – desgraciadamente atribuidos con posterioridad a otros– y de que la respiración de las plantas y animales vician el aire, afirmaba en 1774 que el suelo suministra solamente una parte muy pequeña, aunque absolutamente indispensable de alimento vegetal, constituida por nitrógeno y principalmente por álcalis y fosfatos, los que, en unión de agua pero en mucha menor proporción que ésta, se absorben por las raíces. En 1795 el conde de Dundonald añade los fosfatos alcalinos a la lista de sales nutritivas, pero concediendo un papel primordial al humus como alimento vegetal. El proceso de oxigenación, al progresar en el suelo insolubiliza la materia orgánica y, por consiguiente, la hace inútil para la planta; la caliza, “álcalis y otras sustancias salinas” la disuelven y la convierten en alimento vegetal, de aquí que estas sustancias debieran alternarse con el estiércol al usarlas como abonos, y de aquí, al igual que deducía Wallerius, el que los estiércoles fueran divididos en dos clases: los que aportan directamente alimento vegetal y los que tienen algún efecto indirecto. Todavía en 1796 escribió Kiwan que los álcalis parecen ser el producto del proceso de vegetación pues no existen o se encuentran en cantidades muy escasas en los suelos o en el agua de lluvia; sin embargo, casi medio siglo más tarde, Carl Sprengel (1832) en los años 1830-1840 estudiaba los constituyentes de las cenizas de las plantas considerándolas probablemente esenciales para la nutrición. De este modo se va abriendo paso la teoría mineral y con ella la química agrícola.

3. LA INICIACIÓN DE LA QUÍMICA AGRARIA. LA FISIOLOGÍA VEGETAL Y LA TEORÍA MINERAL

Pese a los avances señalados, bien puede decirse que hasta comienzos del siglo XIX el desarrollo de las prácticas agrarias apenas había sufrido el impacto del avance en el conocimiento científico de la naturaleza. Los agrónomos y los químicos, ignoraban realmente las exigencias nutritivas de los vegetales y todavía estaban argumentando en favor de la “teoría del humus”, sostenida aún hasta mediados de dicho siglo por Thaer, fundador en 1810 de la Primera Escuela Superior de Agronomía en Möglin (Alemania), e incluso, por notables científicos como Humphry Davy, Berzelius y Cuthbert Jonson.

Como más inmediatos precursores de Liebig hay que citar especialmente dos grandes figuras de la química: el malogrado sabio francés Lavoisier y el ginebrino Saussure.

Lavoisier, seguramente a fines del año 1772, precisó que *“Los vegetales toman del aire que les rodea, del agua y, en general, del reino mineral, las materias necesarias para su organización. Los animales se nutren de vegetales o de animales que a su vez se han alimentado con vegetales de manera que las materias que los forman en último término proceden siempre del aire y del reino mineral”*. Desgraciadamente estas ideas no fueron conocidas hasta que Dumas las dio a conocer en 1860 (André, 1918).

Pero la derrota que finalmente permitió llegar a buen puerto facilitó la introducción del método científico experimental en la química agraria por Saussure; aunque todavía en 1804 defendía la teoría del humus, no llegando a formular de modo preciso la restitución al suelo de las materias minerales que contenía; creía que el extracto que se obtiene al tratar el mantillo con agua contribuía a la alimentación de la planta, si bien no tomaba más que una pequeña parte de su propia sustancia. Saussure, a partir de 1804 y en especial en sus memorias de 1822 y 1833 demuestra, asimismo, que las plantas verdes

no tienen más carbono que el que toman del gas carbónico del aire. Elabora una teoría fundamental sobre el humus y las sales minerales, definiendo el primero de una forma que se aproxima mucho a la actual y demuestra que los elementos minerales pese a su exigua presencia en la planta, desempeñan un papel esencial, la forma en que absorben, así como los factores de que depende, anticipando el hecho comprobado modernamente utilizando isótopos radiactivos de que las hojas pueden desempeñar un papel parecido al de las raíces en la nutrición mineral. En fin, Saussure acaba con el **vitalismo** y señala el ocaso del **empirismo** recurriendo a experimentos rigurosos y explicaciones científicas físico-químicas para desentrañar los fenómenos biológicos. Sentó así, las bases de los descubrimientos de Liebig, que dieron paso al **axiomatismo** en la agricultura y de los trabajos iniciados en campo abierto por Boussingault en 1834, modelo para todos los agrónomos posteriores.

“El empirismo y el atraso de las ciencias físico-químicas – decía Liebig– son responsables de que el empobrecimiento del suelo por la agricultura no haya tenido ni una explicación satisfactoria ni un remedio oportuno, pese a que su influencia sobre las naciones es tal que puede expresarse con este aforismo: *“La prosperidad de los pueblos depende de la duración de la fertilidad del suelo”* (Liebig, 1854).

4. LIEBIG, FUNDADOR DE LA MODERNA QUÍMICA AGRARIA

Fueron tantos los originales logros de Liebig en el campo de la química orgánica y de sus métodos de análisis, que, como destaca el profesor Segundo Jiménez, con razón se le puede considerar uno de sus fundadores. Pero fue, sobre todo, el propulsor de sus aplicaciones a la fisiología vegetal y animal, a la agricultura y a la patología. Con sus primeros tres grandes tratados (Liebig 1840, 1840 b y 1842), y los escritores de divulgación en forma de cartas

G. GONZÁLEZ

ANAL. REAL ACAD. NAL. FARM.

(Liebig 1845 y 1851) va dando forma a lo que hoy conocemos como Química agraria.

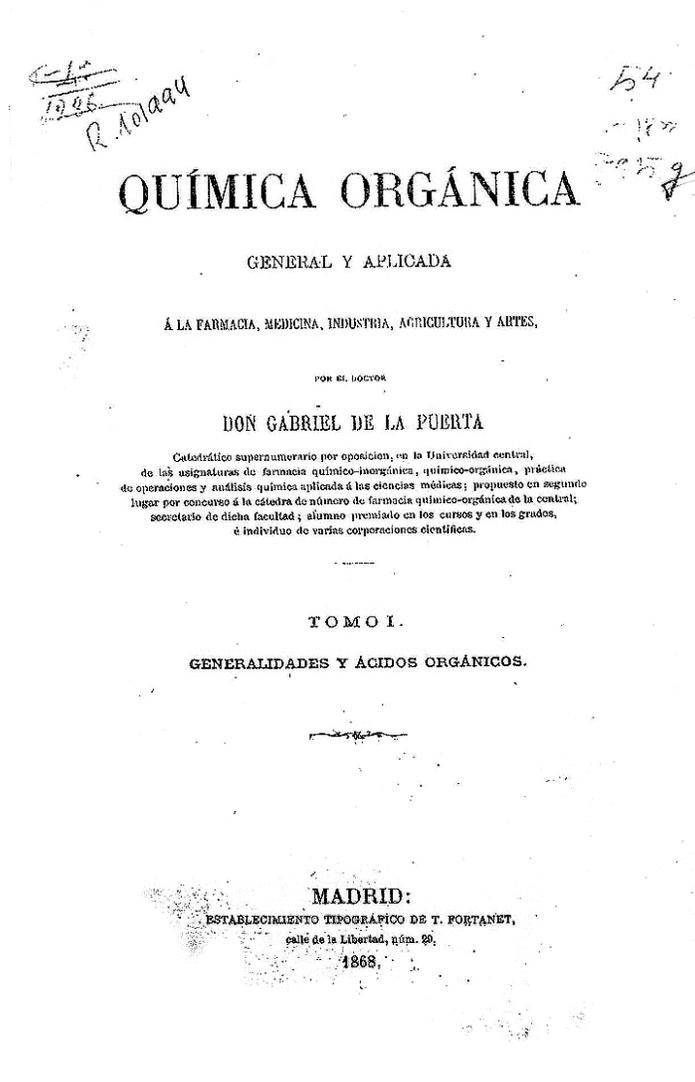


FIGURA 5

Ya el segundo de aquellos (*La química orgánica aplicada a la fisiología vegetal y a la agricultura*) causó un enorme impacto en el mundo de la ciencia, se tradujo a varios idiomas y se tiraron tres ediciones... “Con una exposición elegante y un fino sarcasmo – dice el tantas veces citado Russell– se dedicó a desdeñar a los fitofisiólogos y agrónomos de su tiempo por su continua adhesión, a pesar de las pruebas acumuladas, a la idea de que las plantas derivaban su carbono del suelo y no del ácido carbónico del aire”. “Todas las explicaciones de los químicos quedarán sin fruto e inútiles porque todavía para las grandes cabezas de la fisiología, ácido carbónico, amoníaco, ácidos y bases, son palabras sin significado, palabras sin sentido, términos de un lenguaje que no despiertan pensamientos ni asociaciones. Los experimentos citados por los fisiólogos en apoyo de sus ideas “carecen todos de valor para decidir sobre cualquier cuestión”. “Estos experimentos los consideran ellos como pruebas convincentes y, en realidad, únicamente sirven para despertar piedad”. Y los sarcasmos de Liebig hicieron lo que no habían podido conseguir la lógica de Saussure o de Boussingault: acabar completamente con la teoría del humus y afirmar las bases de la **“teoría mineral”**

Con la teoría mineral Liebig no admitía como sustancias indispensables más que aquellas que aparecían en las cenizas de las plantas. El nitrógeno era de importancia secundaria porque, en su opinión, existía casi siempre una cantidad considerable en los suelos por lo que no había lugar a su restitución.

La nueva teoría mineral – decía también Liebig– admite que el alimento de todas las plantas, a excepción de los hongos, es de naturaleza inorgánica, y que solamente en el organismo vegetal es donde la materia mineral se convierte en una sustancia susceptible de actividad orgánica. Por medio de elementos inorgánicos es como la planta produce todos los principios inmediatos que constituyen su propia sustancia, y que de principios simples nacen los muy complicados de la sangre, de la que todo el organismo animal está formado”. “Los vegetales, argüía, asimismo, tienen

una fuente inagotable de ácido carbónico en el aire, pero se ahorra tiempo en las etapas iniciales del desarrollo vegetal si el ácido carbónico va siendo generado en el suelo, pues entonces – afirmaba erróneamente– penetra en las raíces de las plantas y proporciona una cantidad mucho más elevada de sustancia nutritiva que aquella que están tomando las pequeñas hojas; por esta razón un aporte de humus, el cual está produciendo continuamente ácido carbónico, es ventajoso. Además, el ácido carbónico ataca y disuelve algunos de los compuestos alcalinos del suelo, incrementando así el suministro de alimento mineral. La verdadera función del humus es generar ácido carbónico.

Con el tiempo desarrolló su tesis y le dio forma cuantitativa: *“Las cosechas en un terreno disminuyen o aumentan en proporción exacta a la disminución o aumento de las sustancias minerales aportadas en el abono”*. Más adelante añade lo que después había de considerarse como **Ley del mínimo**: *“Por la deficiencia o ausencia de un constituyente necesario, estando todos los demás presentes el suelo se convierte en estéril para todos los cultivos en la vida de los cuales aquel especial constituyente es indispensable”*.

Los compuestos alcalinos del suelo no son todos igualmente solubles. Sobre ellos actúan procesos de meteorización, facilitados por el encalado y cultivo, llevando los relativamente insolubles a un estado más soluble. La solución final es afectada por el ácido acético excretado por las raíces de las plantas y el material disuelto penetra entonces en el vegetal.

La comprobación de la ganancia de nitrógeno en los prados abonados con álcalis y fosfatos solamente, le llevó a considerar más y más la atmósfera como la fuente de nitrógeno para las plantas, de modo que alguno de los pasajes de la primera y segunda ediciones de sus tratados, urgiendo la necesidad de abonos amoniacales fueron eliminados de ediciones posteriores. “Si el suelo es adecuado, si contiene una cantidad suficiente de álcalis, fosfatos y sulfatos, nada se encontrará en falta. Frente a este Boussingault sostenía que bastaba la aplicación de alguna forma de nitrógeno al suelo para mantener la fertilidad, dando lugar a una controversia que se mantuvo algún

tiempo entre la escuela alemana de los “alcalinistas” acaudillada por Liebig y la francesa de los “azotistas” defendida por Boussingault.

Finalmente afirmó que el nitrógeno se absorbe como amoníaco y este puede provenir del suelo, del abono añadido o del aire. Para que un suelo pueda mantenerse fértil es necesario y suficiente **restituir** bajo la forma de abono los constituyentes minerales y el nitrógeno que le han sido extraídos. Cuando se ha realizado un número suficiente de análisis de cosechas es posible entonces elaborar unas tablas que muestren al agricultor con precisión lo que tiene que añadir en cada caso particular. Siguiendo estas directrices elaboró y colocó en el mercado un abono artificial conocido como “*abono patentado de Liebig*”. Además su descubrimiento de que el tratamiento de los huesos con ácido sulfúrico incrementaba grandemente su valor fertilizante condujo al desarrollo de los superfosfatos por Lawes y Gilbert; y a Knop a desarrollar un abono (líquido de Knop) según su método de preparación de superfosfatos, líquido que aún se utiliza hoy día. Prácticamente sentó las bases de la industria de los fertilizantes químicos y de sus múltiples desarrollos, como los analizados por Segundo Jiménez en 1992.

Liebig dio una explicación racional al aumento de la fertilidad que provoca la práctica del **barbecho**. Frente a la extendida idea de que solamente servía para acumular el agua de lluvia en el suelo durante el año o más sin sembrar para ser aprovechada por la cosecha en que se siembra. Sostenía que el trabajo mecánico que supone al poner en contacto con el aire nuevas capas de tierra desmenuzada acelera la descomposición de la materia orgánica por acción del oxígeno liberando anhídrido carbónico que, en contacto con el agua, solubiliza nuevos elementos minerales.

Asimismo justificaba la **alternancia de cosechas (rotaciones)** por el hecho de sus diferentes necesidades de elementos minerales, siendo siempre la base del cultivo racional la restitución de la totalidad de las materias minerales exportadas (**Principio o Ley de la restitución**).

Liebig, ciertamente, aunque un gran teórico, no podía intuir entonces la enorme complejidad de los procesos implicados en la absorción de los

minerales del terreno por las plantas. Y surgieron las primeras críticas sobre la validez de sus ideas, sobre la adecuada constitución de los fertilizantes que aquel proponía, dado que los resultados prácticos no le avalaban.

Efectivamente, Lawes y Gilbert, –fundadores de la Estación Experimental Agrícola de Rothamsted (Inglaterra) en 1840– habían iniciado en 1852 los experimentos en campo abierto siguiendo las líneas generales de los empezados anteriormente por Boussingault y fracasan en sus ensayos con el “abono patentado”. En consecuencia, afirmaron en 1855, sin discutir la teoría, que las deducciones prácticas de Liebig eran erróneas.

Sin embargo pronto se vio que el abono se había insolubilizado por la fusión con caliza y fosfato de calcio para que no fuese arrastrado demasiado rápidamente con el agua de avenamiento. La futilidad del proceso de fusión no fue descubierta hasta que J.Way, demostró en 1850 que el suelo precipitaba las sales solubles de amonio y de potasio y los fosfatos, y Liebig se hizo cargo de su error. (Russell, 1968).

Después de Liebig y los citados ensayos en campo abierto iniciados por Lawes y Gilbert se sentaron de forma definitiva las siguientes conclusiones:

1° Los cultivos requieren fosfatos y sales de los álcalis, pero la composición de las cenizas no suministra información de confianza acerca de las cantidades que se necesitan de cada constituyente; por ejemplo los nabos necesitan grandes cantidades de fosfatos a pesar de que solo se encuentran en muy pequeña cantidad en sus cenizas.

2° Las especies no leguminosas requieren algo de nitrógeno, siendo igualmente beneficiosos los nitratos y las sales de amonio. Sin un suministro adecuado no se obtiene ningún aumento del desarrollo, aún cuando se añadan los constituyentes de las cenizas. La cantidad de amoniaco obtenible de la atmósfera es insuficiente para las necesidades de una cosecha. Las leguminosas se comportan de manera anormal.

3° La fertilidad del suelo se puede mantener, por lo menos durante algunos años por medio de abonos artificiales.

4º Los efectos beneficiosos del barbecho se deben al aumento en la cantidad de compuestos de nitrógeno y minerales utilizables del suelo.

5º Es conveniente o necesario alternar los cultivos como consecuencia de la absorción diferencial de elementos nutritivos del suelo por las diferentes cosechas.

Pero las aportaciones de Liebig al perfeccionamiento de la agricultura afectaron de modo decisivo también a la explotación ganadera, concretamente a uno de los pilares que la sustenta: la fisiología de la alimentación animal, Liebig en el citado tratado de 1840 y en una obra de divulgación publicada en 1851, coincide con Magendie en desacreditar mediante demostraciones experimentales las tesis vitalistas. Insistía, con razón, en basar positivamente las cuestiones de fisiología en trabajos de Química orgánica.

Además de establecer que los alimentos estaban compuestos de tres principios inmediatos (hidratos de carbono, grasas y proteínas), comunicó sus ideas acerca del metabolismo energético, estableciendo que la energía de origen alimenticio, medida por los diferentes valores caloríficos de las materias alimenticias, es la causa positiva de los fenómenos biológicos fundamentales; asienta así que el calor animal es el simple resultado de un proceso fisico-químico, de una combustión lenta, continua, de estos principios, en el seno de todos los tejidos, siendo sus manifestaciones más visibles la absorción de oxígeno, la correlativa formación de anhídrido carbónico y agua y la liberación de energía térmica (cinética), y que la respiración está relacionada con el movimiento del protoplasma, y con el crecimiento; habla, en fin, de la influencia de las sales en la nutrición y da la composición de las sustancias nitrogenadas de la economía animal y de los efectos de los regímenes alimenticios. En su estudio de los compuestos proteínicos, Liebig (1842, 1843), afirma que el ejercicio muscular de los caballos y seres humanos requería principalmente proteína, no carbohidratos y grasa.

Era tal su autoridad en la Química de aquel tiempo que estos pronunciamientos teóricos fueron generalmente aceptados sin revisión por otros científicos. Guggenheim (1981) destaca el sorprendente hecho de que Liebig nunca llegó a realizar experimentos de fisiología o estudios sobre el balance del nitrógeno en seres humanos o animales. Es sabido que despreciaba a los fisiólogos creyéndoles incapaces de comentar sus cálculos teóricos a menos que alcanzasen su nivel de conocimientos. Pese a ello, en 1850, el fisiólogo Adolf Flick y el químico Johannes Wisleceus – como antes Lawes y Gilbert con el abono patentado–, desafiaron los pronunciamientos dogmáticos de Liebig acerca del papel de las proteínas en el ejercicio. Con simples experimentos midiendo los cambios en el nitrógeno urinario durante una ascensión a la montaña demostraron que la degradación de la proteína no podía hacer aportado toda la energía consumida en el ascenso. Sin embargo, sus nociones de las proteínas como un combustible primario del ejercicio muscular se abrió paso en escritos populares dando pábulo a la idea de que los atletas requieren una mayor proporción de proteína, idea mantenida de forma general hasta bien entrado el pasado siglo y que alguna vez reverdece.

El sino de las prácticas agrarias ha sido siempre ir muy a la zaga de los avances científicos que podían afectarlas directamente, como los derivados de los que se iban alcanzando sobre la forma en que se nutrían – crecían y desarrollaban– los vegetales y animales. Esto fue particularmente cierto en nuestro país. De hecho, pronto se tuvo noticia de los adelantos de Liebig a través de traducciones directos del inglés o, lo más común, del francés (Villar y Macías 1845; Torres Muñoz, 1853) y de publicaciones propias, como la de Casares Rodríguez (1848) o la de Llorente (1892), sin embargo, apenas se reflejaron en la práctica agrícola común.

Paradigmático, es el inicial rechazo a principios del siglo pasado, – según escribe José Cascon (1930) uno de los más sobresalientes ingenieros agrónomos españoles de principios del siglo XX – a los intentos de los vendedores que trataban de introducir abonos minerales y el arado de

vertedera, como consecuencia de los nulos resultados de los nulos resultados de los iniciales ensayos realizados en tierras de secano.

Además de las referidas aportaciones de la agricultura, Liebig dejó su impronta en lo que hoy conocemos como Ecología. En su discurrir acerca de las Leyes de la Naturaleza decía que *“No hay, pues, fenómeno aislado; cada uno está siempre íntimamente a otro u otros muchos que, a su vez se unen entre sí, como los nudos de una red”*, (Peñuelas, 1877), anticipándose al axioma formulado por los ecologistas como 1ª Ley de la Ecología de que *“en la naturaleza no es posible hacer una cosa sola”* (Commoner, 1971).

EPÍLOGO

Como resultado de sus brillantes investigaciones y enseñanzas, apoyadas en contundentes argumentos y a veces sarcásticos comentarios, las aportaciones de Liebig a la agronomía (cultivo de los vegetales y explotación del ganado) pueden sintetizarse en los siguientes términos:

Deshizo la teoría del humus, asentando, frente a ella, la **teoría mineral** como base de la nutrición de las plantas. Con ello creó los fundamentos de la industria de los fertilizantes químicos y de su utilización.

Frente al empirismo que todavía informaba muchos de los escritos sobre agricultura abrió el camino al dogmatismo, a la agronomía, con una explícita formulación de las **leyes de la restitución y del mínimo**.

Dio una explicación racional al aumento de fertilidad que provoca el **barbecho** y la práctica de las **rotaciones de cultivo**.

Determinó la composición de los principios inmediatos que componen los alimentos dividiéndolos en hidratos de carbono, grasa y proteína.

Estableció el papel fundamental de la energía alimentaria en los procesos vitales (respiración y calor animal).

Definió el papel plástico y energético de los alimentos, la influencia de las sales en la nutrición, la composición de las sustancias nitrogenadas de la economía animal y los efectos de los regímenes alimentarios.

Afirmó la interrelación de los procesos de la naturaleza, anticipando la 1ª Ley de la Ecología.

Y en fin, les ruego me disculpen si termino con una apostilla y una digresión.

Es cierto que la fertilización mineral impulsada por Liebig está siendo objeto hoy día de furibundos ataques por los ecologistas. Se la hace responsable del deterioro e, incluso de la esterilización de algunos suelos y de profundas modificaciones de la composición de los alimentos, que pueden afectar a la salud humana. Sin embargo es evidente que ella, en unión de las aplicaciones de la genética y de las mejoras de cultivo (riego, mecanización de las labores, plaguicidas y herbicidas) seguirá constituyendo uno de los tres pilares fundamentales sobre los que se asienta el aumento de los rendimientos de las cosechas vegetales y animales, que permiten combatir las hambrunas y atender a las crecientes necesidades de alimentos de la población mundial, sobre todo en el mundo en vías de desarrollo. Su enorme utilidad lo demuestra el incesante aumento del consumo mundial de fertilizantes nitrogenados (véanse los anuarios estadísticos de la FAO), pese a que en algunas casos se esté cumpliendo la ley de los rendimientos decrecientes. Y así ocurre que en los últimos treinta años se ha duplicado el volumen total de fertilizantes químicos y de la dificultad que tienen para eliminarlos totalmente en la práctica algunos de los defensores de las opciones a la agricultura tradicional que se difunden con los nombres de agricultura biológica, biodinámica, ecológica, de conservación, sostenible, etc.

Liebig, en fin, como algunos otros sobresalientes científicos de su época, no se dejó arrastrar por el positivismo comtiano... *“En efecto, el Creador, en su infinita bondad, – decía– ha previsto con más grande sabiduría; y esa mano Todopoderosa ha inscrito los preceptos que el hombre debe seguir en el gran libro de la Naturaleza”* y seguía Liebig *“Además le*

ha dado la razón, una parte de El mismo, y le ha dotado de la facultad de leer su libro y de comprender el orden divino que ha establecido en el mundo; le ha hecho, en fin, dueño de sus destinos, y le ha puesto en la mano los instrumentos de su prosperidad y porvenir” (Peñuelas, 1877).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANDER, G. (1918) “Química Agrícola. Química Vegetal”. Enciclopedia Agrícola G. Very. Barcelona.
- (2) CASARES RODRÍGUEZ, A. (1857) “Manual de Química General con aplicaciones a la Industria y con especialidad a la agricultura” 2ª ed. Cipriano López. Madrid.
- (3) CASCÓN, J.(1935) “Una deducción errónea” En “Agricultura Española”. Antología de artículos, monografías y conferencias. Direcc. Gral. De Agricultura. Madrid.
- (4) COMMONER, B. (1971) “The Closing Circle” N.Y. Ed. A. Knopf. En Mc GEE, CH, T., 1992. “Cómo sobrevivir a los riesgos de la tecnología moderna. Leyes de la Ecología”. Ed. Paidós. Barcelona.
- (5) CHARRO DE LORENZANA, P. (1917) “Agronomía o Diccionario manual del labrador. Contiene todos los conocimientos necesarios para gobernar haciendas de campo. Trad. Del francés. Madrid.
- (6) GUGGENHEIM, K.Y.(1981) “Nutrition and Nutritional Diseases”. Lexington, M.A.: Collamore. Press.
- (7) HIDALGO DE TABLADA, J. (1851) “El agrónomo. Periódico dedicado a los labradores españoles”. Imp. Colegio. Sordomudos. Madrid.
- (8) JIMÉNEZ GÓMEZ, S.(1992) (coordinador) “Fertilizantes de Liberación Lenta”. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.
- (9) LOSTAO CAMÓN, J. (2003) “La investigación agraria en España. Informe”. Fundación Alonso Martín Escudero. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- (10) LIEBIG, v.J (1847-48) “Tratado de Química Orgánica”, Trad. de la versión francesa de C.H. Gerhardt por Saez y Palacios R. y Scardini Ferrari, la Ilustración. Madrid
- (11) LIEBIG, v.J.(1840) “Química Orgánica aplicada a la agricultura y a la fisiología” Traducida del inglés, 1842. Cádiz.
- (12) LIEBIG, v.J (1842) “Organic Chemistry and its applications to Physiology and Pathology”.
- (13) LIEBIG, v.J (1845) “Cartas sobre la Química y sobre sus aplicaciones a la Industria, a la Fisiología y a la Agricultura”. Traducido del francés por J. Villar y Macías Salamanca.

- (14) LIEBIG, v.J (1851) “Nuevas cartas sobre la Química considerada en sus aplicaciones a la Industria, a la Fisiología y a la Agricultura”. Edición española por R, Torres Muñoz, Madrid, pp. 536.
- (15) LIEBIG, v.J (1857) “Les lois naturelles de l’Agriculture”. Edición francesa revisado por el autor. Lib. Agric. Et de la Maison Rustique, París. En Peñuelas L. (a) Vol. I, pp. 104.109; (b), p28 (c) “La Agricultura y la Historia” Cap. VI
- (16) LLORENTE A (1892) “Los abonos” Burgos. Introducción p.VIII
- (17) PEÑUELAS, L (1877) “El aire, el agua y las plantas”,
- (18) RUSSELL, E.W (1968) “Condiciones del Suelo y crecimiento de las Plantas”. Ed. Aguilar, Madrid. Traducción del inglés 9ª edición. Ed. Aguilar, Madrid. “Soil Conditions and Plant Growth”. Por González, G.
- (19) SAUSSURE, T (1804) “Recherches quimiches sur la vegetation”. Prefacio, París.

Relevancia de Liebig en el desarrollo de la Química Orgánica

CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Liebig vivió una época en que la estructura y reactividad de los compuestos orgánicos representaban un rompecabezas para los químicos. Gracias a su trabajo e inteligencia se abrieron caminos para resolverlo.

1. BREVE RESEÑA BIOGRÁFICA. LOS ORÍGENES DE UNA VOCACIÓN

La vocación de Justus von Liebig (1803-1873) por la química hay que buscarla en el trabajo de su padre, que regentaba una droguería en Darmstadt [1,2]. Algunos de los artículos que se vendían en el negocio familiar, fundamentalmente pinturas y barnices, se preparaban en un pequeño taller en el que también trabajó Liebig cuando la pobreza de una familia tan numerosa como la suya le impidió continuar su formación como aprendiz de farmacia en Heppenheim. Al parecer, estas carencias económicas le avergonzaron posteriormente y pretendió explicar que la interrupción de aquel aprendizaje se debía a la realización de experimentos sin la autorización del boticario. Desde 1817 a 1819, completó el trabajo en el taller paterno con lecturas de libros de química que, procedentes de la biblioteca del duque Ludwig de Hessen-Darmstadt, eran accesibles gracias a las ideas de la Ilustración acerca del interés que dicha materia tenía en la economía. De esta forma, a los 17 años estaba decidido a convertirse en un químico o en un industrial químico.

Inició sus estudios como ayudante personal de Kastner, un cliente de su padre que enseñaba en la Universidad de Bonn y más tarde en Erlanger, dedicándose con ahínco al latín y al francés, las matemáticas y la química, llevando al mismo tiempo una intensa vida social y política que en ocasiones fue poco adecuada para la época. En 1822 consiguió una beca para estudiar el análisis de sustancias minerales y orgánicas en París

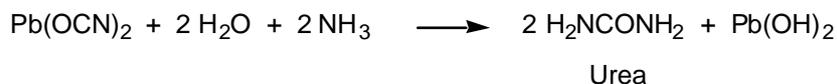
con Gay-Lussac y, al terminar estos trabajos en 1824, recibió el grado de Química por la Universidad de Erlangen. En 1826, el luterano Liebig contrajo matrimonio con la católica Henriette Moldenhauer, de la que tendría 5 hijos.

Mientras **Liebig** trabajaba con **Gay-Lussac** en París en el análisis del **fulminato de plata**, **Wöhler**, que era un recién licenciado en medicina que trabajaba en el laboratorio privado que **Berzelius** tenía en Estocolmo, analizaba el **cianato de plata**. El fulminato de plata originaba un 77,53% de óxido de plata y un 22,47% de ácido ciánico, la misma relación que encontró Wöhler para el cianato de plata. Sin embargo, aquél era explosivo (detona violentamente por percusión, choque o contacto con una llama) y el cianato de plata no lo era [3]. La **identidad de los ácidos ciánico y fulmínico en cuanto a su composición química** se demostró posteriormente, y llevó a Berzelius a enunciar la **doctrina de la isomería**, de enorme trascendencia en la química orgánica porque indujo a pensar que las sustancias no sólo se definen por el número y clase de átomos que las componen, sino también por su organización.



Isomería de los aniones cianato y fulminato

Estos trabajos fueron el origen de la amistad inquebrantable entre ambos estudiantes, aunque antes Liebig tuvo que desdecirse de sus primeras acusaciones acerca de la incorrección de los análisis de Wöhler. Fue también Wöhler quien en 1828 realizó un hallazgo todavía más sensacional: que la urea extraída de la orina de perro tenía la misma composición que el cianato amónico. Los cristales de urea se habían formado cuando, intentando preparar cianato amónico por reacción entre el cianato de plomo y el amoníaco (Esquema 1), dejó que la cristalización transcurriera a temperatura ambiente en vez de por evaporación de la solución:



ESQUEMA 1.- Formación de urea a partir de cianato de plomo y amoníaco

Este hallazgo echaba por tierra la teoría de la “fuerza vital”, que sostenía que los componentes de los seres vivos no podían ser sintetizados. Tanto Wöhler como Liebig habían demostrado que la riqueza de la química orgánica está basada en las infinitas posibilidades que poseen los elementos simples carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, fundamentalmente, para combinarse entre ellos.

Humboldt, por entonces embajador de Prusia en Francia, recomendó a Liebig para un puesto académico al gran duque de Hessen-Darmstadt. La química, hasta entonces una materia que estudiaban fundamentalmente los médicos, se proyectaba hacia la agricultura, la industria y la minería. En 1824 Liebig llega a la Facultad de Filosofía de Giesen, a la que se trasladaron estudiantes de farmacia que antes estudiaban en la Facultad de Medicina. En 1825 la muerte de Zimmermann, catedrático de Química de la Universidad de Darmstadt, deja a Liebig en disposición de desarrollar sus nuevas ideas acerca de la enseñanza de la química y le permite compatibilizar ésta con la enseñanza de conocimientos generales de farmacia.

La vida de Liebig como profesor de universidad es paradigmática en muchos aspectos: 1) Aprovechó todas y cada una de las oportunidades que la vida le fue proporcionando para desarrollar sus talentos como científico experimental, como publicista y como escritor. 2) Tuvo desde el principio de su actividad como profesor universitario programas de investigación y de docencia bien concretados: el análisis de los compuestos orgánicos y la enseñanza práctica de métodos de análisis cualitativo y cuantitativo, respectivamente. 3) Tenía la convicción creciente de la utilidad de sus conocimientos, y pudo hacer coincidir su obligaciones como docente en una universidad estatal con las de director

de un instituto farmacéutico privado, lo que hoy día llamaríamos captación de recursos públicos y privados.

2. LIEBIG Y EL ANÁLISIS ORGÁNICO

Para diferenciarse de los alquimistas, los químicos alemanes de finales del XVII empezaron a sustituir la palabra “Chemie” por “Scheidkunst”, que significa “**arte de la separación**”. Sin sustancias homogéneas es inútil el análisis y, por aquel entonces, la química era el arte del análisis, que en su vertiente cuantitativa se fue abriendo paso desde los ensayos de metales hasta originar la certeza de que muchos compuestos estaban formados por proporciones constantes y definidas de otros, cuestión que dio lugar a las leyes estequiométricas. Sin embargo, los analistas eran grandes expertos que no aportaban explicaciones teóricas, y los teóricos poseían técnicas experimentales muy pobres.

El avance de la química animal y vegetal se veía frenado en la primera mitad del XIX no sólo por la teoría de la “fuerza vital”, sino por las dificultades del análisis orgánico. William Prout, por ejemplo, estuvo 12 años buscando un instrumento y una técnica que permitiera análisis precisos de los compuestos orgánicos hasta que, desesperado, renunció. Berzelius fue excepcional en el dominio de la teoría y de la práctica, por lo que pudo demostrar junto con Thomson que los pesos atómicos o equivalentes podían determinarse con gran exactitud. De esta forma, sus trabajos dieron cuerpo a la teoría atómica que había formulado Dalton. Sin embargo, **los métodos para determinar el contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno de los compuestos orgánicos eran gasométricos, y dependían de la exactitud en las mediciones de dióxido de carbono y agua.** Para realizar esta transformación, Lavoisier oxidaba la materia orgánica a fin de facilitar su destrucción antes de la destilación final, pero la naturaleza de los agentes oxidantes que utilizaba no quedó reflejada por escrito tras su muerte. Gay-Lussac y Thenard utilizaron para este propósito clorato potásico, aunque este oxidante tenía muchos inconvenientes porque era un proceso lento y peligroso. Berzelius perfeccionó el instrumental de Gay-Lussac y Thenard, y pasó de las

determinaciones volumétricas a la determinación directa del CO₂ y del agua por pesada tras su absorción y condensación.

Tras la introducción por Gay-Lussac del óxido de cobre como oxidante en 1815, **la técnica de Berzelius fue mejorada por Liebig en sencillez, precio y fiabilidad**, popularizando su famoso aparato, que era definido en 1831 por su inventor como sigue: *“No hay nada nuevo en ese aparato, salvo su simplicidad y la total fiabilidad que permite”*. Con estas mejoras, Liebig podía realizar en una semana el trabajo que Berzelius hubiera realizado en ocho meses. Otra de las aportaciones prácticas de Liebig que ha llegado a nuestros laboratorios es el refrigerante que lleva su nombre.

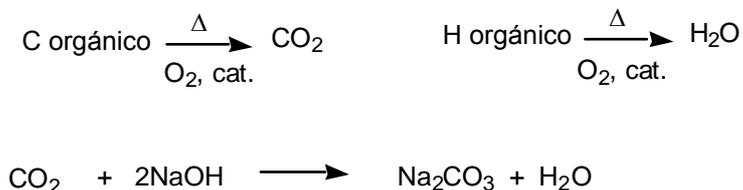
En 1830, Liebig publicó en alemán y en inglés, como hizo con casi todos sus libros, un manual para estudiantes titulado **“Instrucciones para el Análisis de los Cuerpos Orgánicos”**. En él utilizaba carbón mineral como fuente de calor en vez de carbón vegetal o alcohol, el agua se absorbía en una ampolla de cloruro cálcico anhidro, y el dióxido de carbono en soluciones de hidróxido potásico situadas en botellas dispuestas convenientemente. El oxígeno se determinaba por diferencia, y el nitrógeno y otros elementos como el azufre, se determinaban por separado. Si se exceptúa la fuente de calor, el método de Liebig está vigente en la actualidad.

El método de análisis orgánico de Liebig, rápido y preciso, fue el secreto de su éxito profesional pero, además, permitió que se establecieran relaciones entre los compuestos orgánicos y se realizara su posterior clasificación.

He aquí un párrafo extraído de la Primera de sus *Chemical Letters* [4] acerca de la **importancia de la balanza en la experimentación química**: *“La gran diferencia entre la manera de actuar en la química y en la filosofía de la naturaleza es que la una pesa y la otra mide. El filósofo de la naturaleza ha aplicado sus medidas durante muchos siglos, pero nosotros sólo llevamos cincuenta años intentando avanzar en nuestros conocimientos a través de la pesada. Todos los grandes descubrimientos químicos se deben a la balanza- ese instrumento incomparable que da permanencia a todas las observaciones, disipa*

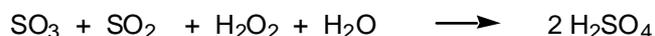
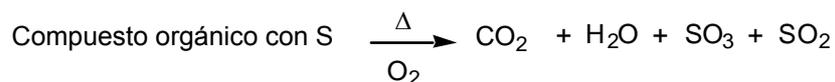
todas las ambigüedades, establece la verdad, detecta el error, y nos guía por el verdadero camino de la ciencia inductiva.”

A pesar de la importancia que tiene medir exactamente el contenido de carbono e hidrógeno de los compuestos orgánicos no existe hoy día un ensayo universal, aunque se emplean las técnicas de microcombustión puestas a punto por Pregl hacia 1930. Éstas se basaron en los procedimientos desarrollados en la época de Liebig: la combustión del material orgánico, la eliminación de los elementos que interfieren, y la medida del dióxido de carbono y del agua que se forman, absorbidos generalmente sobre ascarita (NaOH sobre asbestos) y perclorato magnésico, respectivamente (Esquema 2). A partir de la diferente pesada de los tubos que contienen estos absorbentes antes y después de la combustión, se calcula la cantidad de carbono y de hidrógeno [5]. Además de una corriente de oxígeno, los tubos en que se lleva a cabo la combustión de un compuesto orgánico contienen distintos catalizadores: sales de plata, óxido de cobre, de magnesio, de tungsteno o de zirconio, dióxido de plomo o de manganeso, cromato de plomo, etc.



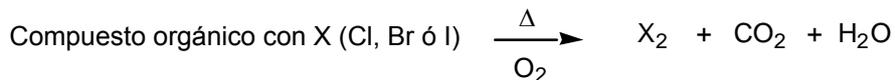
ESQUEMA 2.- Combustión del material orgánico y medida del CO₂ y H₂O formados

La eliminación de los elementos que interfieren la determinación cuantitativa del carbono y del hidrógeno, azufre, halógenos y nitrógeno, también varía. El azufre se convierte en SO₂-SO₃, y puede absorberse por la plata en forma de Ag₂SO₄ (o por el dióxido de manganeso), y determinarse después por descomposición del material orgánico hasta convertir el S en una forma que pueda medirse (por ejemplo como sulfato bórico precipitado) tras la eliminación de los iones que interfieran (Esquema 3).



ESQUEMA 3.- Determinación analítica del azufre en un compuesto orgánico

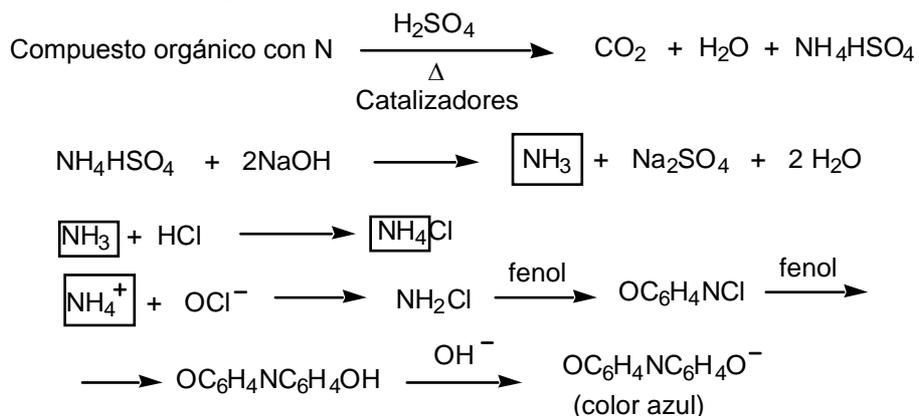
Los halógenos, a excepción del flúor que requiere un tratamiento diferente, se eliminan también en el tubo de combustión por la plata, y si se escapa el cloruro de este tubo se absorbe igualmente por el dióxido de manganeso. La determinación cuantitativa de cloro, bromo ó iodo en un compuesto orgánico, requiere los tres pasos indicados en el caso del azufre. La descomposición por combustión los transforma en halógeno molecular (X_2) y éste, previa eliminación de otros iones que pueden interferir en la medida como ocurre con otros haluros, cianuro y mercapturos, puede absorberse sobre una solución de carbonato sódico. La determinación del haluro (X) puede hacerse potenciométricamente por titulación con nitrato de plata, por intercambio iónico, o por otros métodos (Esquema 4).



ESQUEMA 4.- Determinación analítica de halógenos en compuestos orgánicos

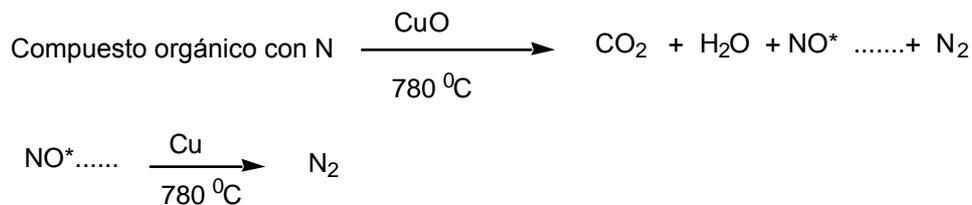
El dióxido de manganeso puede absorber también los óxidos de nitrógeno producidos en la combustión de los compuestos orgánicos que

contienen nitrógeno. Existen dos métodos tradicionales para determinarlo: el de Kjeldahl y el de Dumas. En el primero, que a veces requiere un tratamiento previo de la muestra, se realiza la digestión del compuesto orgánico con ácido sulfúrico en presencia de diversos catalizadores, y el sulfato ácido de amonio que así se forma libera amoníaco cuando se trata con hidróxido sódico. El amoníaco eliminado se valora por titulación con ácido clorhídrico o por espectrofotometría utilizando fenol-hipoclorito como reactivo (Esquema 5).



ESQUEMA 5.- Determinación analítica de nitrógeno en los compuestos orgánicos. Método de Kjeldahl

En el método de Dumas, introducido en 1831 y adaptado posteriormente a microescala por Pregl, la oxidación a alta temperatura catalizada produce nitrógeno u óxidos de nitrógeno (NO*), que finalmente se reducen a nitrógeno molecular y éste se mide de diferentes formas (Esquema 6). Algunas muestras requieren un tratamiento previo.



ESQUEMA 6.- Determinación analítica de nitrógeno en los compuestos orgánicos. Método de Dumas

Actualmente, los analizadores son aparatos automáticos que conservan el principio de la combustión pero que utilizan una columna cromatográfica para la separación y determinación, por un detector de conductibilidad térmica o de captura de electrones, de los diferentes gases: CO_2 , H_2O , N_2 y SO_3 [6].

3. LIEBIG, LA QUÍMICA ORGÁNICA Y LA ENSEÑANZA PRÁCTICA DE LA QUÍMICA

Al parecer, cuando Liebig fue nombrado a los 21 años profesor Ayudante de Química en la insignificante Universidad de Geissen, lo que planeaba era establecer una escuela privada de farmacia pero, aunque tuvo un gran número de alumnos que fueron boticarios, su fama derivó de su dedicación a la enseñanza práctica de la química. En unos barracones abandonados montó en un primer momento un laboratorio que sería el más famoso del mundo en la enseñanza práctica de un método de análisis orgánico que tenía el éxito asegurado (Figura 2).

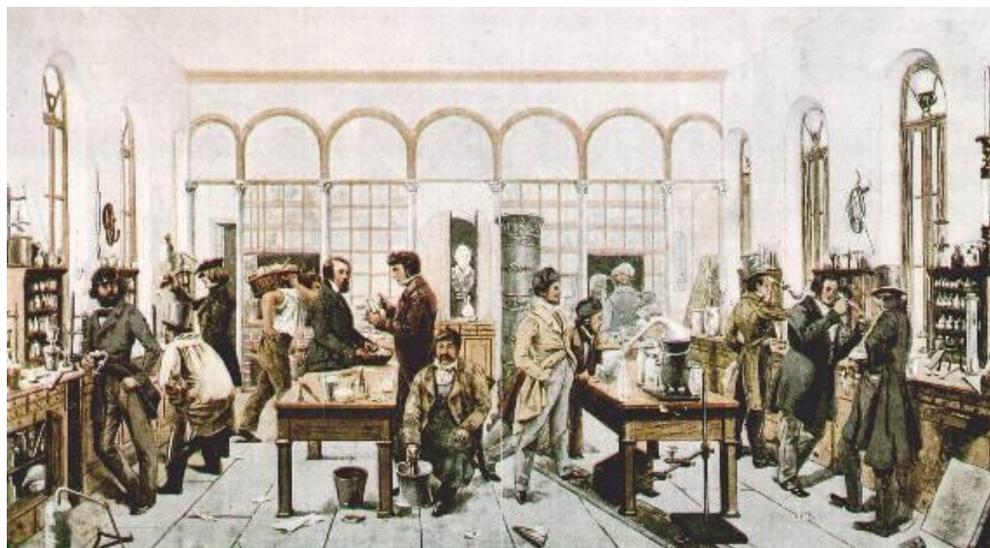


FIGURA 7.- Laboratorio de Liebig según un grabado de la época

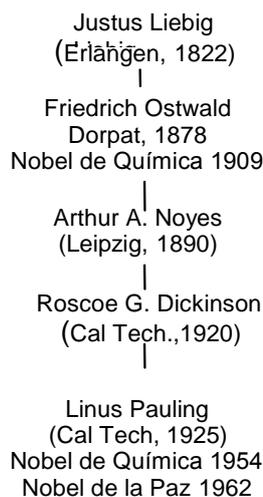
Como consecuencia de sus primitivos trabajos sobre los fulminatos y los cianatos, Liebig dirigió su investigación durante la década de 1820 a la Química Orgánica. Su amigo el farmacéutico de Heidelberg Phillipp Geiger, con el que colaboró en la edición de la revista *Magazin für Pharmacie* que pretendía la difusión de la ciencia farmacéutica, le motivó a interesarse por los **alcaloides**. Al parecer, la ayuda de Liebig fue decisiva en la expansión de la empresa Merck, originalmente una farmacia de Darmstadt fundada en 1668, hacia la producción industrial de alcaloides en esta década. La citada revista se llamó desde 1832 *Annalen der Pharmazie* y, siendo Liebig su único editor tras la muerte de Geiger, se hizo más química denominándose *Annalen der Chemie und Pharmazie*. Geiger pretendía comprobar la exactitud de las novedades que publicaban los químicos alemanes y extranjeros y Liebig era el encargado de esta comprobación. Los *Annalen* se convirtieron en lectura indispensable y fueron la voz de Liebig y sus discípulos en todo el mundo. A cambio, se granjeó bastantes enemigos.

Dada la situación económica de los profesores de química de la época, si cobraban poco a sus alumnos a fin de que su número fuera suficiente, no lograban cubrir los grandes gastos necesarios para el mantenimiento de los laboratorios, mientras que si aumentaban los precios, el número de alumnos disminuía y sólo los de farmacia estaban suficientemente motivados ante la perspectiva de ejercer como boticarios. En consecuencia se optaba en general por tasas bajas, aulas abarrotadas y algunas demostraciones prácticas en las conferencias. Algunos de nosotros hemos conocido este tipo de enseñanza y debemos admitir que aun hoy se justifican por razones económicas las deficiencias de muchas enseñanzas prácticas. Pero Liebig también fue pionero en la tarea de conseguir fondos gubernamentales, y en 1833 pudo unir su escuela privada y su curso oficial de la universidad. Los primeros barracones dieron paso a modernos laboratorios de química y de farmacia, que pudieron instalarse con ayuda estatal. El laboratorio de química incluía unas primitivas vitrinas de trabajo con salida de humos [7]. A estos laboratorios acudían **estudiantes de todo el mundo**, siendo famoso el

sistema triangular de cinco bolas de cristal llenas de hidróxido potásico de su *Kaliapparat*, que se fabricaba en el propio laboratorio.

Los cursos de Liebig, en los que el laboratorio tenía una gran importancia, sirvieron de modelo para todos los laboratorios del mundo. Uno de los alumnos en la U. de Giesen que se entusiasmó con las lecciones de Liebig fue August **Kekulé** von Stradonitz (1829-1896). En 1857 éste propuso que el carbono era tetravalente, en 1858 publicó en los *Liebig's Annalen der Chimie und Pharmacie* un célebre trabajo acerca de cómo los átomos de carbono pueden enlazarse unos con otros, y en 1865 propuso la idea de que el benceno tenía la estructura de un anillo.

Cuando en 1852 Liebig se trasladó a la Universidad de Munich habían pasado por sus clases más de 700 estudiantes de química y de farmacia, los cuales fueron mentores de importantes químicos entre los que se encuentran algunos Premios Nobel (Figura 11) [8]. Uno de éstos fue **Linus Pauling**, nacido en 1901 en Portland, Oregón, fue Premio Nobel de Química en 1954 y premio Nobel de la Paz en 1962. Su interés por desentrañar la naturaleza del enlace químico derivó de los primeros trabajos de F.W. Ostwald, acerca de la afinidad química. Ostwald, a su vez, tuvo como supervisor a C. Schmidt, uno de los estudiantes de Liebig, y siendo el director de Noyes, éste ofreció una beca a Pauling, aunque finalmente fue Dickinson, uno de los estudiantes de Noyes, quien dirigió la formación de Pauling (Figura 6). A **Liebig y Pauling se debe en gran parte el empuje que experimentó la investigación química en los siglos XIX y XX**, respectivamente.



Árbol “genealógico” desde Liebig hasta Pauling

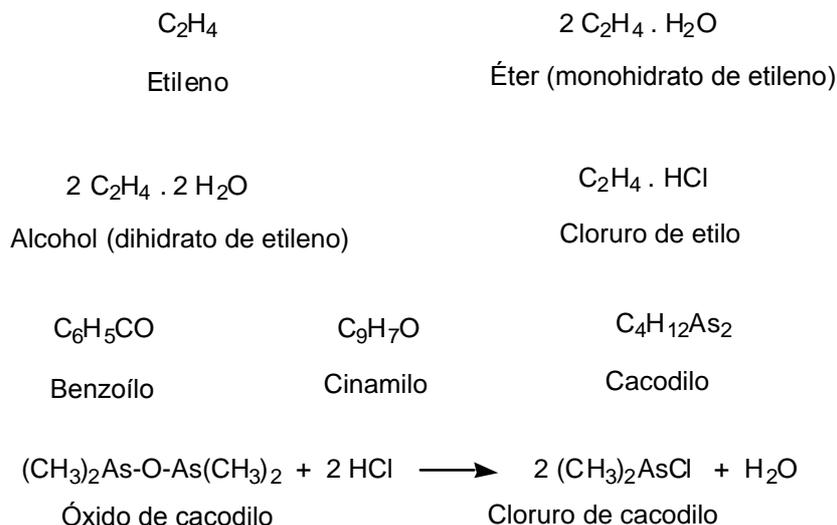
Fue en 1852 cuando Liebig vio desvanecer su entusiasmo como profesor, empezó a rechazar nuevos estudiantes, y se dedicó cada vez más a las aplicaciones de la química en la vida y a diversas actividades literarias. La causa de este rechazo hay que buscarla en el agotamiento que le habían producido las múltiples discusiones científicas en las que se vio implicado. **No puede olvidarse que fue alrededor de 1870 cuando la química alcanzó un grado de madurez suficiente para establecerse como una disciplina científica.**

4. LIEBIG Y LOS RADICALES ORGÁNICOS. LA CUESTIÓN DEL ÉTER Y OTRAS TEORÍAS

Además de otras contribuciones a la química orgánica, tales como la introducción en 1834 de **subíndices** (en vez de índices) para agrupar los símbolos de los átomos del mismo tipo en las fórmulas moleculares, o el estudio de varias sustancias cloradas (como el **cloral**), Liebig participó activamente en el desarrollo de la **teoría de los radicales orgánicos**.

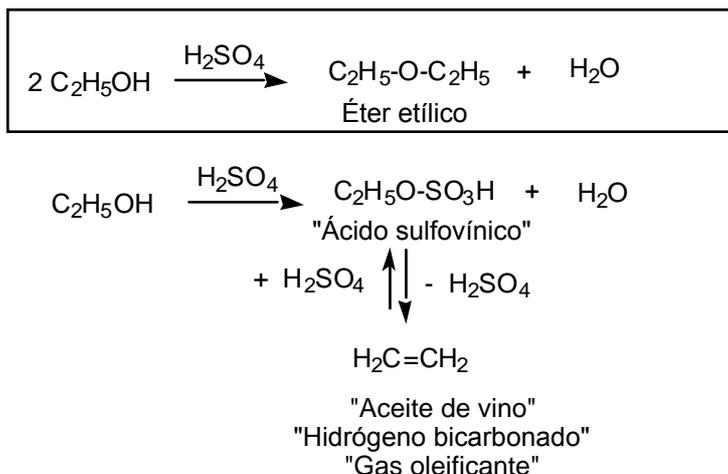
El primer radical orgánico fue descubierto en 1815 por Gay-Lussac. Era el “radical cianuro” (CN⁻). Pero la mayor relevancia correspondió a

los trabajos de Dumas con el alcohol, el éter y el cloruro de etilo, a los que consideró combinaciones del etileno (denominado por entonces “gas oleificante”: C_2H_4) con el agua o el ácido clorhídrico. Berzelius denominó a este radical “eterina”, observando que podía también combinarse con el amoníaco para dar un compuesto de carácter básico. Después del radical benzoílo de Liebig y Wöhler, Dumas y Péligot encontraron el radical cinamilo (C_9H_7O) y, finalmente, Bunsen pudo demostrar en 1837, experimentando con compuestos de arsénico muy explosivos y peligrosos, la existencia del radical cacodilo ($C_4H_{12}As_2$), que se comportaba como un radical divalente pero que podía también aislarse en estado libre. **Liebig y Dumas escribieron entonces un artículo definiendo la química orgánica como la química de los radicales compuestos.** El camino quedaba abierto para identificar estos radicales y clasificarlos, aunque la teoría de los radicales ya entonces no podía resolver muchos problemas. En el esquema 7 se recogen las estructuras propuestas en este período para algunos radicales orgánicos.



ESQUEMA 7.- Formulación propuesta para algunos de los primitivos radicales orgánicos

En 1827 los químicos estaban muy interesados en un compuesto al que se denominaba **“ácido sulfovínico”** que procedía de una de las reacciones más importantes e incomprensibles en la química orgánica de la época: la **conversión del alcohol etílico en éter por la acción del ácido sulfúrico**. La complejidad de esta reacción era debida a la formación de diversos productos según las condiciones en que se realizaba. El ácido sulfovínico contenía azufre y una sustancia compuesta por carbono e hidrógeno. Dumas y Boullay creían que el azufre estaba en forma de ácido sulfuroso y que la otra sustancia era el “aceite de vino”, al que dieron la fórmula C^4H^3 y, sobre esta base, definieron en 1828 la existencia del **“radical hidrocarburo”**. Hennell demostró que el “aceite de vino” contenía igual proporción de carbono e hidrógeno (**“hidrógeno bicarbonado”**) y consideró que el “ácido sulfovínico” era un intermedio en la reacción de eterificación del alcohol etílico (ver el esquema siguiente). El análisis de esta reacción por Serullas concluía igualmente que el hidrocarburo del ácido sulfovínico era el hidrógeno bicarbonado que se combinaba con agua para dar éter. Este conflicto de opiniones inclinó a Liebig y Wöhler a estudiar dicho ácido en 1831. Enseguida demostraron que la fórmula C^4H^3 de Dumas y Boullay era incorrecta, pero la cuestión de decidir si el gas oleificante se combinaba con agua para formar éter o se unía directamente con el ácido sulfúrico era más compleja. Al no poder aislar el ácido sulfovínico trataron de deducir su composición analizando su sal bórica, pero los resultados de su análisis podían interpretarse suponiendo que el ácido sulfovínico contiene ácido sulfúrico anhidro combinado con alcohol o, lo que parecía más probable, ácido sulfúrico diluido combinado con éter. **Aunque estos estudios parecían explicar cómo el ácido sulfovínico era un intermedio en la formación del éter, no aclaraban si el alcohol y el éter eran combinaciones del mismo hidrocarburo, ni la teoría de que el gas oleificante fuese un radical** (Esquema 8).



ESQUEMA 8.- Conversión del alcohol etílico en éter por la acción del ácido sulfúrico. Ácido "sulfovínico"

Berzelius, aunque reticente, analizaba con gran interés estas ideas, y propuso que el gas oleificante no era el radical hidrocarburo sino que éste debería ser un múltiplo al que llamó "eterina". La cuestión del éter prosiguió, y Pelouze descubrió un ácido semejante al sulfovínico, pero más estable, que se formaba a partir del alcohol y el ácido fosfórico: el ácido fosfovínico. Liebig realizó el análisis de su sal de bario, que era cristalina, e hizo énfasis en la necesaria eliminación de las moléculas de agua de cristalización para la determinación correcta del carbono y del hidrógeno. Éstas y otras experiencias llevaron a Berzelius a desechar el radical "eterina", y a proponer que el alcohol y el éter no podían ser hidratos del mismo radical sino que eran óxidos (equivalentes a los inorgánicos) de diferentes radicales compuestos de carbono e hidrógeno. Para Berzelius el éter era $\text{C}^4\text{H}^{10} + \text{O}$ y el alcohol $\text{C}^2\text{H}^6 + \text{O}$. Liebig no podía aceptar que el alcohol fuese un óxido que tuviese un radical distinto del éter y, de acuerdo con sus experiencias con los ácidos sulfovínico y fosfovínico y, sobre todo, de la conversión del alcohol en éter por pérdida de agua, **propuso que el alcohol era el hidrato del éter y ambos**

contenían el mismo radical al que llamó **etilo** y dio el símbolo **E** (Figura 7).

Berzelius:

Éter : $C^4H^{10} + O$;

Alcohol: $C^2H^6 + O$

Liebig:

Éter: E (radical etilo) + O

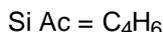
Alcohol: EO + H^2O

Liebig y el radical etilo (E)

Entre las muchas controversias de **Liebig** con los químicos de la época destaca la mantenida con **Dumas** acerca de la composición del alcohol y el éter, el cloral o la oxalamida. Ambos **eran conscientes de la necesidad de formular teorías generales para organizar la gran cantidad de datos analíticos que empezaba a emerger, y de que muchas de ellas serían erróneas**. Liebig consideró a Dumas el dirigente de la escuela francesa y que ésta estaba en contraposición a la que él lideraba en conjunción con Berzelius. De hecho, a partir de 1830 ambos tenían opiniones opuestas acerca de diversas cuestiones teóricas y experimentales. En 1837 Liebig buscó una reconciliación científica con Dumas y ambos se propusieron cooperar en el futuro. Sin embargo, cuando Dumas hizo pública esta alianza en una nota a la Academia de Ciencias de París titulada “Sur l'état actuel de la chimie organique”, en vez de resolverse los problemas, ambos encontraron la reacción hostil de muchos químicos orgánicos porque sus trabajos no eran suficientemente considerados. Ante esta situación, Liebig impidió la publicación de dicha nota en alemán y siguió luchando en solitario por sus teorías.

En una publicación de 1835 sobre el acetaldehído, Liebig consideró a este compuesto una combinación del hipotético radical C_4H_6 . La reacción del alcohol con el bromo o el yodo originó compuestos a los que Regnault asignó la fórmula C_4H_6Br y C_4H_6I y, considerándolo que derivaban del mismo radical C_4H_6 “descubierto” por Liebig en el acetaldehído, le llamó aldehído. Este radical fue rebautizado por Berzelius

como **radical acetilo (Ac)** y Liebig lo extendió en 1839 a la estructura de los compuestos que en un primer momento se interpretaban con las teorías del etilo o de la eterina (Figura 8).



- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1) $\text{AcH}_2 =$ gas oleificante | 3) $\text{AcH}_4\text{O} =$ éter |
| 2) $\text{AcH}_4 =$ etilo | 4) $\text{AcH}_4\text{O} + \text{H}_2\text{O} =$ Alcohol |

Liebig y el radical acetilo (Ac)

Otra cuestión que resultó especialmente problemática para los químicos orgánicos del XIX fue interpretar la **acidez de los ácidos orgánicos**. Había que resolver las múltiples contradicciones y paradojas que surgían con los descubrimientos de nuevos ácidos aislados de fuentes naturales o producidos por calentamiento de éstos (los llamados “ácidos pirogénicos”). Liebig fue distanciándose de Berzelius en estos problemas, y en 1838 publicó un artículo sobre los ácidos orgánicos titulado “**Über die Constitution der organischen Säuren**”. En él considera, inspirándose en las características del ácido fosfórico, que algunos ácidos orgánicos neutralizan más de un equivalente de base.

Los años en que Liebig se ocupaba de la teoría del éter y de los ácidos orgánicos, llevaba a cabo importantes investigaciones con Wöhler. En el verano de 1832, Liebig y Wöhler repitieron y ampliaron los experimentos que habían realizado en 1830 los farmacéuticos franceses Robiquet y Boutron-Charlard oxidando el aceite de almendras amargas (hoy sabemos que el componente principal de este aceite es el **benzaldehído**). Tras realizar con él varias reacciones, observaron que en los productos que éstas originaban, se encontraba un mismo grupo químico ($\text{C}^{14}\text{H}^{10}\text{O}^2$, dos veces lo que hoy diríamos $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$) al que denominaron **radical benzoílo**. Aunque no pudieron aislarlo, dedujeron que el aldehído benzoico, el ácido benzoico, el cianuro de benzoílo, la

benzoilamina, etc., estaban formados por este radical oxigenado Berzelius calificó este estudio como el paso más importante realizado en la química de las plantas.

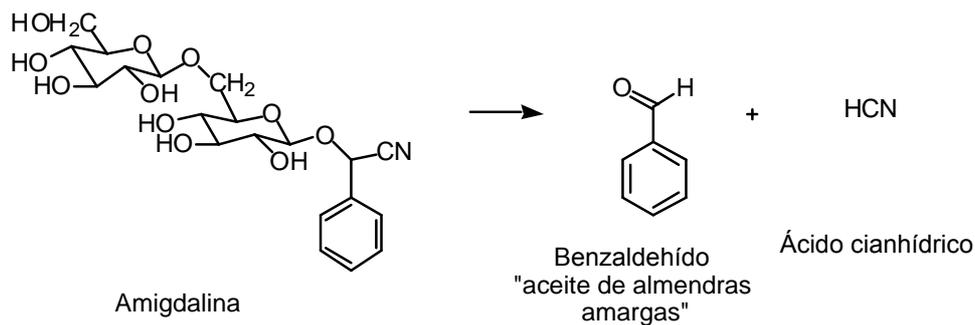
Según Berzelius, los compuestos orgánicos obedecían a las mismas leyes que los inorgánicos, con la única diferencia de que aquéllos eran combinaciones binarias y éstos eran con frecuencia ternarias o cuaternarias en las que había oxígeno combinado con un radical que contenía generalmente carbono, hidrógeno y nitrógeno. Los compuestos orgánicos podrían expresarse en fórmulas de tipo $(XYZ)^+O^-$, en las que X corresponde a C, Y a H y Z a N. Buscando las analogías entre los compuestos inorgánicos y orgánicos, si el ácido sulfúrico por ejemplo era $(SO^3 + H_2O)$, el ácido acético podía ser $[(C^4H^6)O^3 + H_2O]$ siendo el radical C^4H^6 el equivalente al azufre en el ácido sulfúrico [9]. Los radicales eran “restos” no oxigenados. Por eso a Berzelius, que llamaba a los radicales “seudoelementos”, no le agradó que el oxígeno electronegativo estuviera incorporado en el radical benzoílo de Liebig y Wöhler.

Liebig apuntaba el nacimiento de la química orgánica como algo separado de la inorgánica en la Primera de sus Chemical Letters: *“Una nueva ciencia, inagotable como la vida misma, se nos presenta, sobre la sólida base ya establecida de la química inorgánica.”* Según Liebig: *“El radical forma la parte no alterable en una serie de combinaciones, y se puede reemplazar en éstas por otros grupos más sencillos; en sus combinaciones con un cuerpo sencillo, puede el último ser separado y sustituido por un equivalente de otro cuerpo más sencillo”.*

Liebig se volvía más flexible a medida que reconocía que no había ninguna teoría capaz de explicar satisfactoriamente la composición de la materia orgánica y empezó a considerar que Berzelius, hasta entonces su mentor, era demasiado inflexible para una perspectiva de futuro. Por ello, a pesar de su enfrentamiento con Dumas, empezó a compartir con él la convicción de que **la química orgánica era mucho más compleja que la inorgánica, y que requería nuevas reglas.**

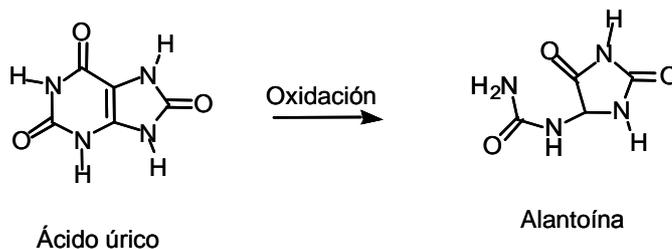
En 1836 Wöhler descubrió el modo de transformar la **amigdalina** por destilación con manganeso y ácido sulfúrico en **aceite de almendras**

amargas y ácido cianhídrico y sospechó que esta descomposición se producía con la colaboración de una sustancia llamada “emulsina” (previamente caracterizada en esta materia orgánica junto con Liebig), que actuaba como la levadura con el azúcar y podía ser un ejemplo de lo que Berzelius había definido como **catálisis** (Esquema 9). Empezaba a conocerse la acción de los **fermentos**.

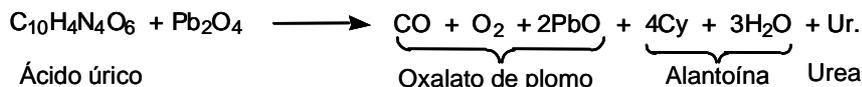


ESQUEMA 9.- Descomposición de la amigdalina

Fue también Wöhler quien introdujo a Liebig en otro gran descubrimiento. En 1837 le comunicó que había conseguido identificar los constituyentes del **ácido úrico** ($C_5H_4N_4O_3$). Descomponiendo éste en agua con peróxido de plomo como agente oxidante había aislado urea, ácido carbónico y una sustancia cristalina incolora. Liebig determinó inmediatamente la estructura de esta sustancia, la **alantoína** ($C_4H_6N_4O_3$). Sobre la base de que los compuestos que poseían 4 elementos debían



Interpretación de Liebig:



formarse por la unión de compuestos binarios, **Liebig interpretó que el ácido úrico era un derivado de urea** (Ur.) con un ácido desconocido que contenía el radical del ácido oxálico (CO) combinado con cianógeno (Cy) (Esquema 10).

ESQUEMA 10.- Interpretación de la estructura del ácido úrico

Posteriormente, ambos químicos estudiaron la reacción del ácido úrico con ácido nítrico. En ácido nítrico diluido y amoníaco se producía oxalurato amónico ($C_6H_8N_4O_8$). En ácido nítrico concentrado se producían unos cristales solubles en agua de una sustancia que llamaron **aloxana** ($C_8H_8N_4O_{10}$), y si había un exceso de amoníaco se producía la sal amónica del ácido purpúrico, al que posteriormente denominaron **murexida** ($C_{12}H_{12}N_{10}O_8$). Otras descomposiciones del ácido úrico

originaron muchos otros compuestos, pero **Liebig y Wöhler no estaban capacitados para determinar sus estructuras de forma racional**, ya que estaban admitiendo “a priori” que la urea estaba presente como tal en todos ellos. Estos trabajos ocuparon a Liebig hasta 1839, aunque para entonces su tarea principal era la de escribir libros de texto.

Después de la década de los 30 en que fue centro e impulsor del rápido crecimiento de la química orgánica, la lucha acerca de la teoría de la sustitución de Dumas llegó a su punto más álgido. Fue entonces cuando Liebig empezó a sentir aversión hacia las actividades de la química orgánica y escapó del callejón sin salida en que se encontraba esta materia.

Su relevancia para la química orgánica puede determinarse: 1) por los métodos de análisis orgánico que inventó o refinó; 2) por los muchos compuestos y reacciones que descubrió o describió; 3) por la calidad de sus razonamientos, que permitieron ver a sus contemporáneos y seguidores cómo podía desarrollarse esta ciencia; 4) por su nueva forma de entrenar a los químicos en el laboratorio.

5. LIEBIG Y LA QUÍMICA APLICADA

En 1838 Liebig empezó a interesarse por la química de las plantas y de los animales analizando diversos fluidos y tejidos. Estudió en particular los compuestos nitrogenados, y concluyó que el ejercicio muscular necesitaba muchas proteínas pero no grasas ni hidratos de carbono [10]. Liebig era ya considerado el mejor químico de Europa, lo que se demostró en sus dos viajes triunfales a Gran Bretaña en 1837 y en 1844.

Además de desarrollar un extracto de buey y dar su nombre a productos comerciales con suplementos proteicos para niños o adultos (Figura 3), sus nuevas ideas quedaron reflejadas en un libro publicado en 1840 también en versión inglesa que tituló “Organic Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology”. Éste tuvo mucha influencia, especialmente entre los agricultores de Estados Unidos [11]. En 1842 publicó “Organic Chemistry in its Application to Physiology and

Pathology” y con un inusitado optimismo respecto al entendimiento desde la química orgánica de la fisiología, las enfermedades y sus tratamientos, manifestó en la Sexta de sus *Chemical Letters*: “*A partir de este momento no tenemos dificultades para entender las diferentes acciones de los alimentos, venenos y medicinas –tenemos un concepto claro sobre las causas del apetito, la naturaleza exacta de la muerte; y no estamos como antes obligados a contentarnos con la mera descripción de unos síntomas.*”

Según las teorías de Liebig, las plantas toman el carbono y el nitrógeno directamente del aire, y no del humus como se creía hasta entonces, mientras que los nutrientes inorgánicos se absorben del suelo. Por tanto, recomendó la utilización de fertilizantes minerales para completar los elementos de éste que han sido consumidos. En 1845 inventó y patentó en Alemania y Gran Bretaña un fertilizante mineral. Éste se fabricó en una factoría del padre de uno de sus discípulos: James Sheridan Muspratt, quien a su vez publicó entre 1854 y 1869 un diccionario por entregas de 2000 páginas titulado “*Chemistry: Theoretical, Practical and Analytical*” en el que se describían muchos procesos industriales. Desgraciadamente, los resultados de este fertilizante fueron un desastre para muchos agricultores, ya que Liebig había pensado que era más adecuada una fórmula insoluble que evitara su eliminación por el agua del suelo antes de ser absorbida.

Según Liebig, existe un balance en los animales y el hombre entre la ingesta, la excreta y los gases de la respiración. Parte del oxígeno de ésta se consume para romper las fibras musculares y otras sustancias no nitrogenadas a fin de producir calor. Sólo las sustancias capaces de transformarse en sangre deben ser consideradas como nutrientes propiamente dichos. Muchas de sus afirmaciones, como que los músculos se regeneran durante el sueño, se demostraron posteriormente como falsas ya que sorprendentemente no se basaron en experimentos fisiológicos. Sin embargo, otras permanecen irrefutables.

Contaba 70 años cuando falleció en 1873 dejando una enorme huella en el desarrollo de la química orgánica. Había publicado alrededor

de 200 trabajos de investigación originales y había revolucionado el aprendizaje de la química a través de la experimentación [12, 13].

El reconocimiento hacia su persona por parte de las sociedades científicas y de la sociedad en general se reflejan en el emblema de la American Chemical Society que incluye la representación del aparato que Liebig diseñó para cuantificar los gases de la combustión de las sustancias orgánicas.



FIGURA 8.- Emblema de la American Chemical Society con el *Kaliapparat* de Liebig

La Sociedad Alemana de Química otorga una medalla que lleva su nombre.



FIGURA 9.- Medalla de Liebig de la Sociedad Alemana de Química

Y, para terminar, ¡hasta uno de los cráteres de la luna lleva su nombre!.



FIGURA 10.- Cráter de la luna que lleva el nombre de Liebig

BIBLIOGRAFÍA

- (1) PARTINGTON, J.R.(1964) "A History of Chemistry", Vol. 4, Macmillan.
- (2) BROCK, W.H. (1992) "Historia de la Química", Alianza Editorial.
- (3) Para una comparación de ambos ácidos ver Karrer, P.: "Tratado de Química Orgánica", 2ª edición española traducida por C. Torres, Manuel Marín, ed. 1944, pág. 272-277.
- (4) Las "Liebig's Chemical Letters" fueron publicadas por Child. P., un lector de Química de la Universidad de Liimerick.
- (5) SHUGAR, G.J. *ET AL.* (1981) "Chemical Technicians' Ready Reference Handbook", McGraw-Hill, 2ª ed., Pág. 627-644.
- (6) ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A.:(2000) "Analyse Chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes", Ed. Dunod, 5ª ed., Pág. 356-361.
- (7) Hofmann, un hijo del arquitecto de esta reforma, fue con el tiempo uno de sus discípulos predilectos y el más famoso de sus alumnos.
- (8) SACHTLEBEN, R.(1958) "Nobel Prize Winners Descended from Liebig", *Journal of Chemical Education*, 35, pág. 73-75.
- (9) Para un comentario más extenso ver: KARRER, P.(1944) "Tratado de Química Orgánica", 2ª edición española traducida por C. Torres. Manuel Marín (ed), pág. 22-27.
- (10) CARPENTER, K.J.(1994) "Protein and Energy: A Study of Changing ideas in Nutrition", Cambridge University Press.
- (11) SCHARRER, K.(1949) "Justus von Liebig and Today's Agricultural Chemistry", *Journal of Chemical Education*, 26, pág. 515-518.
- (12) TWIGG, C.A.; TWIGG, M.V.(1973) "Centenary of the death of Justus von Liebig", *Journal of Chemical Education*, 50, pág. 273-274.
- (13) "Dictionary of Scientific Biography",(1981) Gillispie Ch.C. (ed.), Ed. C.S.S., Vol. 7 (Landsteiner, I-K., ed.), pág. 329-350.

Aportaciones del Barón Justus von Liebig a la nutrición

BERNABÉ SANZ PÉREZ

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. ANTECEDENTES

Durante el siglo XVIII y primeros lustros del XIX todavía eran muy pocos los conocimientos nutritivos y muchos de ellos eran de naturaleza especulativa y basados en los 4 principios aristotélicos y en las enseñanzas de Galeno, a las que se aferraban la mayoría de los médicos en ejercicio.

De hecho de desconocía la composición química de los alimentos, se carecían de ensayos químicos fiables y algunos instrumentos tan utilizados después, como la balanza, el microscopio y los higrómetros estaban en sus primeras fases de desarrollo. Sin embargo, los deseos de saber y experimentar eran más fuertes que nunca a lo que contribuyeron muchas figuras señeras que vivieron en los siglos XVII y XVIII y que iniciaron entusiastamente el despertar científico (Galileo, Malpighi, Gay-Lussac, Van Leeuwenhoek, Robert Boyle y otros muchos cuyos trabajos tanto contribuyeron al avance de la ciencia de los siglos XVII – XVIII). La *Royal Society* Británica, fundada en 1662 y la *Academie des Sciences* francesa, nacida dos años más tarde, constituyeron lugares de encuentro de cuantos participaron en el despertar científico.

Era muy poco lo que se sabía sobre digestión de los alimentos ya que, como acabamos de señalar, predominaban las ideas de Galeno. Sin embargo, fue a mediados del decenio de 1620, cuando un profesor de la famosa Universidad de Padua, Sanctorius, describió en su *Medicina Statica* la llamada *perspiratio insensibilis*, esto es, la pérdida de peso que no puede explicarse en su totalidad por la eliminación de orina y heces. Para ello ideó una cámara en la que situó una silla que pendía del brazo de una romana. Sentado en la silla, después de ingerida una comida copiosa, iba registrando las pérdidas de peso indicadas en la romana. Concluyó

que acaecían por la boca y por la piel. Sanctorius pensó que las pérdidas de peso se debían solo al agua eliminada ya que desconocía la naturaleza del aire y de los gases.

Fue Robert Boyle quien demostró que tanto el aire como los gases eran sustancias materiales, y que, como tales, tenían peso. Quizá convenga recordar (Sanz, 1988) que Robert Boyle también contribuyó al desarrollo de la entonces incipiente tecnología de los alimentos al idear un sistema de conservación de la carne que permitía mantenerla en condiciones de comestibilidad durante el tiempo que se invertía en el viaje desde Londres a las Indias Orientales (unos 6 meses). Consistía en asar ligeramente la carne, cortarla en trozos pequeños y envasarla, sin dejar huecos, en una orza o tinaja. Para ello se le adicionaba mantequilla fundida hasta que cubría totalmente la carne y la orza se tapaba con una tela y una tapa de madera. Boyle insistía mucho en la importancia de excluir el aire.

2. ÉPOCA DE FABULACIONES

Un suceso que gozó de gran notoriedad, durante los primeros 3 lustros del siglo XIX en las Islas Británicas, fue la historia de Ann Moore, una señora de Tutbury de quien se decía que llevaba cinco años sin comer ni beber porque tras una larga enfermedad había perdido todo deseo de agua y alimentos. Mucha gente, incluidos su propio médico y el párroco local, lo creyeron a pie juntillas, hasta que el Dr. Alexander Herdenson, un médico de la nueva escuela y como tal, entusiasta partidario de la experimentación, descubrió el fraude y lo dio a conocer en un opúsculo titulado *An examination of the imposture of Ann Moore*, Londres, 1813.

Ahora sonreímos ante la ingenuidad de quienes creían en fantásticas historias de este tipo, mas no debe olvidarse que por entonces nadie sabía que la energía calórica y la mecánica eran interconvertibles y hasta finales del siglo XVIII se desconocía que la fuente de calor animal eran los alimentos, como demostró Lavoisier; tampoco se conocía la ley de la conservación de la energía. En una época en la que no se tenía ni idea de los complejos mecanismos responsables de la degradación oxidativa de los alimentos, no tiene nada de extraño que, como dicen

Drummond y Wilbraham (1958), muchos de los coetáneos de Moore admitieron “la existencia de una persona singularmente constituida que pudiera vivir mucho tiempo sin comida ni bebida”.

Las ideas sobre la combustión eran tan primitivas que hasta algunas personas, relativamente cultas, admitían que la muerte se producía a veces por un fuego espontáneo. Liebig dedicó un artículo entero en su fascinante serie de Cartas de Química. (*Familiar Letters on Chemistry*, 4th Ed., 1858) a refutar la creencia de que, una persona pudiera arder espontáneamente y consumirse sin dejar más rastro que una mancha de grasa y un montón de cenizas.

3. PRIMERAS INVESTIGACIONES

Por entonces se desconocían las necesidades alimenticias esenciales de la especie humana, pues únicamente se estimaban basándose en la cantidad de alimentos consumidos. Con tales conocimientos era pues imposible establecer los requerimientos alimenticios de distintos grupos de población. Pero algunos científicos de la época buscaban ya sistemas más racionales: François Magendie estudió el comportamiento de los perros a los que solo se les administraba, durante mucho tiempo, el mismo alimento y observó que únicamente con la carne gozaban de buena salud. Si en su lugar se les daba azúcar, pan o grasa los animales perdían peso, enfermaban y morían transcurrido cierto tiempo. La sintomatología de estos animales correspondía a lo que dos siglos más tarde se conocerían como avitaminosis.

Los experimentos de Magendie tuvieron mucha resonancia en Inglaterra y un famoso médico, anatómico y cirujano, el Dr. Sir Astley Cooper llevó a cabo ensayos con diferentes alimentos para establecer su digestibilidad relativa. Es curioso que entre los más digestibles incluyese al magro de cerdo.

4. NUTRICIÓN Y FISIOLÓGIA CIENTÍFICAS

Para progresar en el conocimiento de la composición química y en las funciones de los alimentos, Liebig se basó posiblemente en los trabajos de

Magendie. Hacia 1840 el profesor alemán gozaba ya de muchísimo prestigio en la Europa continental y sus trabajos comenzaron a conocerse y popularizarse en Inglaterra, pero tardaron dos años en ser admitidos por los círculos científicos de la isla. A este conocimiento contribuyó Lyon Playfair que había sido discípulo y colaborador de Liebig en Giessen. Cuando regresó a su país inició una auténtica labor misionera para dar a conocer las nuevas ideas de su maestro exponiendo en las reuniones de la Sección de Química de Glasgow, que estaba adscrita a la *British Association of Chemistry*, una serie de resúmenes breves de las lecciones de Liebig.

Casi a la vez apareció la traducción inglesa de su Química Animal (*Animal Chemistry or Organic Chemistry in its application to Physiology and Pathology*) que puso a disposición de los Británicos los avances alcanzados por la escuela experimental alemana y las enormes ventajas logradas con la aplicación del análisis químico a la fisiología y la nutrición. Liebig y colaboradores no solo realizaron los primeros análisis fiables de composición química de los alimentos sino que aprovecharon los resultados para estudiar cuantitativamente sus funciones. Para ello se basó, sin duda alguna, en la clasificación de los alimentos de Magendie, que los dividía en nitrogenados y no nitrogenados, pero Liebig fue mucho más lejos que el sabio francés ya que consideró a los nitrogenados como esenciales para la formación de los músculos y otros tejidos y por ello los denominó *elementos plásticos de la nutrición*. En cambio pensaba que los no nitrogenados eran la principal fuente de calor y energía animal porque al componerse solo de carbono, oxígeno e hidrógeno eran el combustible principal del organismo, rindiendo al quemarse u oxidarse CO₂ y agua. Por ello los llamó *elementos respiratorios de la nutrición*.

Quizás sea conveniente señalar otro hecho, ocurrido en la misma sesión científica de la *British Association* de Glasgow, para ver cómo avanzaban también en pleno siglo XIX las ciencias fisiológicas y por tanto la nutrición.

En la misma sesión, la sección de Medicina aprobó conceder una subvención, no menor de 200 libras “para estudiar la química de la digestión, reservando parte de la misma para que viajase a Gran Bretaña el Dr. William Beaumont” y expusiese allí sus estudios sobre la digestión.

El Dr. Beaumont había despertado mucho interés en las reuniones médicas británicas por haber publicado en 1833 en Boston (EE.UU) un libro donde describe una serie de experimentos sobre la digestión gástrica, realizados con Alexis St. Martin quien tenía en la pared del abdomen un orificio bastante grande que comunicaba directamente con el interior de su estómago.

Alexis St. Martin era un joven cazador franco canadiense a quien se le disparó accidentalmente un rifle que le produjo una grave herida que le afectaba al tórax y al abdomen. El Dr. Beaumont, entonces oficial médico de Fort Mackinac, hizo las primeras curas al herido y su pronóstico fue muy pesimista. Sin embargo y ante el asombro general, después de pasar un año en cama en el hospital, St. Martin se fue recuperando lentamente hasta recibir el alta médica. Pero la cicatrización, tuvo lugar uniéndose los bordes de la herida gástrica con los de la abertura originada por el disparo en la pared abdominal, lo que le dejó como secuela, un hueco o fistula permanente por donde podía contemplarse lo que ocurría en el estómago. El Dr. Beaumont, comprendiendo la gran oportunidad que suponía la fistula para profundizar en los estudios de la fisiología de la digestión, no solo convenció a St. Martin para que compartiera con él su domicilio, sino que lo alimentó y cuidó con todo esmero hasta que recuperó por completo la salud. Entonces firmaron un contrato en el que St. Martin se comprometía “a ir, viajar y residir en cualquier parte del mundo” con el Dr. Beaumont y “a someterse, ayudar y promover con todas sus fuerzas los experimentos” del citado doctor.

Los más de 200 experimentos realizados en el estómago de St. Martin los recoge Beaumont en un libro que publicó a mediados de 1833 y que como facsímil se reprodujo en 1929, precedido de un prólogo de Sir W. Osler. Sirvieron para demostrar que la teoría que decía que los alimentos se digerían por putrefacción, trituración, fermentación y maceración era totalmente falsa. Comprobó asimismo que la disolución de la carne en el estómago era un proceso químico, como había postulado Liebig, realizado por un componente gástrico que era el ácido clorhídrico, y observó que el jugo gástrico lo producían unas pequeñas glándulas de la mucosa que vertían directamente en el estómago y vio que tanto su volumen como su carácter estaban influenciados por el tipo de alimentación, las alteraciones

mentales y el ayuno. Puso pues los fundamentos de las excelentes contribuciones que daría a conocer setenta años más tarde el gran fisiólogo ruso Pavlov.

5. LA IMPORTANCIA DE LOS ALIMENTOS NITROGENADOS

Los primeros trabajos analíticos de Liebig fueron fundamentales para poder conocer después el valor nutritivo de las proteínas. En los alimentos de origen vegetal descubrió tres sustancias ricas en nitrógeno a las que llamó:

- Fibrina vegetal o gluten
- Albúmina vegetal o coagulable, y
- Caseína vegetal, llamada así porque precipitaba de sus soluciones por la adición de ácidos, lo mismo que hacía la caseína láctea.

El análisis químico elemental de estas tres sustancias demostró que contenían las mismas proporciones de carbono y nitrógeno, lo que unido a otras particularidades le llevaron a concluir que tenían la misma composición. Comprobó igualmente que formaban parte de toda la materia. Sin embargo, esta idea la había expuesto antes que Liebig, otro gran químico sueco, Jöns Jacob Berzelius, quien señaló que toda la materia viva, tanto animal como vegetal, contenía una sustancia nitrogenada compleja que era de fundamental importancia para los seres y a la que le dio el nombre de proteína.

Liebig siempre pensó que las proteínas de la leche, carne, huevos y otros alimentos de origen animal eran idénticas en composición química a las proteínas vegetales. Por ello enseñaba que los animales herbívoros fabricaban sus tejidos directamente a partir de las proteínas de las plantas, a las que después de digeridas y absorbidas convertían en proteínas sanguíneas que finalmente darían lugar a la musculatura y a otros sistemas y órganos. Estas ideas, a pesar de su simpleza serían las que dominaron la nutrición casi durante medio siglo. Pensaba asimismo que las proteínas se absorbían como tales, sin experimentar cambio alguno.

Puesto que, según los análisis de Liebig, todas las proteínas tienen la misma proporción de nitrógeno parece lógico que se empleara la cantidad

total de este elemento en los alimentos como índice y método para establecer su “valor como formadores de tejido”.

Sin embargo, el comportamiento de la gelatina era a este respecto paradójico, o al menos extraño, ya que por la proporción de nitrógeno que contenía no se diferenciaba en nada de las restantes proteínas y no obstante, *carecía de valor como formadora de tejido*”. Liebig, que era bastante obstinado, repasó cuidadosamente sus análisis pero no halló nada que explicase un comportamiento tan anómalo. Por ello y sin más base experimental dio por zanjado el asunto diciendo que no era una proteína ordinaria por lo que no debía esperarse que formase sangre y carne y añadió que su papel podría ser el de formar el material de la matriz de los huesos y la porción gelatinosa de los tendones. La explicación de Liebig, gracias a su prestigio personal, sirvió para calmar a sus coetáneos pero, como señalan con cierta ironía Drummond y Wilbraham (1958), para sus enfervorizados discípulos no fue nada tranquilizador tener que admitir que un compuesto nitrogenado, tan abundante en el cuerpo animal, careciera de valor como formador de tejidos.

Séame permitido añadir que el gran fisiólogo francés Magendie había comprobado experimentalmente, antes que Liebig, la paradoja de la gelatina. Lo hizo en respuesta a un proyecto de investigación, promovido por la Academia de Ciencias francesa que deseaba saber “si era económicamente factible extraer de los huesos un alimento que, solo o mezclado con otras sustancias, pudiera sustituir a la carne”. Magendie, que había observado en experimentos previos que los alimentos nitrogenados eran esenciales para la vida, quedó muy sorprendido al comprobar que cuando los perros se alimentaban con carne, como única fuente de nitrógeno, mantenían su buen estado de salud, y desarrollaban normalmente toda su actividad. En cambio, si la carne se sustituía por gelatina que tiene igual cantidad de nitrógeno, los animales adelgazaban rápidamente, enfermaban y morían pronto. Concluyó que no todos los alimentos nitrogenados tenían el mismo valor formador de tejidos o poder sarcopoyético.

Serían los fisiólogos y bioquímicos de principios del siglo XX y sobre todo Emil Fischer y su escuela en Alemania quienes encontrarían, en 1912, la causa del anómalo comportamiento de la gelatina: su pobreza en

triptófano, aminoácidos azufrados y en tirosina que, a pesar de su riqueza en glicina (24%), la convierten en una proteína de nulo valor nutritivo, debido a que el triptófano, al ser un aminoácido indispensable, no lo sintetiza el organismo.

Emil Fischer y colaboradores descubrieron en 1912 que había una gran variedad de proteínas que diferían en propiedades y complejidad estructural pero que tenían en común el estar constituidas por la combinación de muchas unidades más pequeñas, los aminoácidos que, en un símil muy acertado, algunos han comparado con “ladrillos” con los que podrían construirse edificios o proteínas con muchas cosas iguales pero a la vez totalmente diferentes en estructura, tamaño y complejidad.

6. OSMAZOMA, CALDOS Y SOPAS

Liebig participó también –al principio sin demasiado interés pero después activamente- en una pequeña discusión sobre la *osmazoma* que se desarrolló en ciertos círculos científico-culturales. Bajo el nombre citado se describía, en los libros de cocina de la época y también en algunos de química alimentaria, al “principio sávido y odorífero, soluble en alcohol” contenido en el material marrón que se formaba a partir del jugo de la carne, cuando ésta se asaba en recipientes de hierro o cerámica. Algunos lo consideraban como un compuesto de gran interés nutritivo. Además de estimular el apetito por su aroma y sabor agradables, parecía muy nutritivo por su riqueza en nitrógeno. De aquí que pronto derivase la discusión hacia el valor como formador de tejidos de la osmazoma y por extensión al valor nutritivo de caldos, sopas y extractos de carne.

A comienzos del siglo XIX ya se sabía, al menos en ciertos medios científicos, que cuando se cocía la carne “coagulaban” sus proteínas y que en estas condiciones eran insolubles. Sin embargo, al analizar el líquido claro y acuoso en el que se había cocido la carne, esto es, el caldo, se encontró que contenía cantidades apreciables de nitrógeno. Liebig comprobó que una parte del mismo era gelatina y otra la formaban sustancias distintas de las proteínas. Pero éstas continuaban siendo el residuo más voluminoso de la carne cocida. Es muy posible que Liebig se preguntase, como harían quizás otros, si esos compuestos nitrogenados

distintos de las proteínas y uno de los cuales era la osmazoma, tenían algún valor nutritivo.

Liebig que por entonces ya sabía, por propia experiencia, que la gelatina carece del poder de formar tejidos, pensó que el caldo debía tener algo verdaderamente nutritivo puesto que, en países como Francia, los labriegos se encontraban en muy buenas condiciones físicas y gozaban de excelente salud alimentándose corrientemente con caldos o sopas, patatas, otras hortalizas y pan integral. Concluyó que los componentes nitrogenados de los caldos no contribuían a la sarcopoyesis pero sí ejercían un cierto efecto estimulante del apetito y del tono general del organismo que seguramente era beneficioso. El valor nutritivo de los caldos lo atribuyó a las sales minerales extraídas de la carne por la cocción. Seguramente por ello afirmó en la 4ª Edición inglesa de sus *Cartas Familiares de Química* (1858):

“Por tanto no puede mantenerse que la pérdida de valor nutritivo de la carne lixiviada se deba a la sustracción de los componentes orgánicos solubles del jugo; consecuentemente hemos de buscar la causa de este fenómeno en los componentes incombustibles de la sopa o jugo de la carne”

7. EXTRACTO DE CARNE

Todas estas ideas e investigaciones y sus deseos comerciales llevaron a Liebig a la explotación industrial del extracto de carne.

En torno a 1850 tanto en América del Sur como en Australia había tal producción de carne que los precios cayeron en picado ocasionando la ruina de muchos estancieros y rancheros. Fue entonces cuando Liebig pensó en poner en marcha un proceso de fabricación de extracto de carne que había descrito en 1847. Sin embargo, tal proyecto no sería realidad industrial hasta diecisiete años después, en 1864, cuando se inauguró una planta elaboradora en Fray Bentos (Uruguay).

La aparición en el mercado del “*Extractum carnis* de Liebig” tuvo una gran resonancia y desde el primer momento atrajo la atención del público por la propaganda y publicidad de que estuvo rodeada. Se alegaba que una libra del producto contenía concentrada la esencia de 36 libras de

carne y que proporcionaba la cantidad básica de este alimento necesaria para nutrir a 128 personas. Como era natural impresionó al mercado en una época en la que la carne seguía siendo cara en Europa y cuando era muy apreciada, incluso en círculos médicos. Gran parte de la población culta admitía con naturalidad que, proporcionara, como alegaban los fabricantes, los principios nutritivos de la carne en una forma muy concentrada.



FIGURA 11.-Una de las etiquetas de suplementos de proteínas (extractos de carne) con el nombre de Liebig

Sin embargo, la prestigiosa Real Sociedad de Artes Británica, que había sido fundada en 1754, designó en 1866 un Comité de expertos para que “investigase e informase sobre la alimentación de la población”. Su respetada opinión fue que los extractos de carne de este tipo no eran alimentos en el sentido corriente de la palabra sino que deberían considerarse “estimulantes nerviosos”. Más tarde, el Dr. Pavy (1867),

prestigioso médico y fisiólogo, señaló que “el hecho de que se necesiten 36 libras de carne para lograr solo una de extracto demuestra que la sustancia de la carne que constituye su verdadera porción nutritiva, está excluida casi completamente”.

Liebig lamentó mucho estos ataques y se sintió especialmente dolido por quienes criticaron su extracto, sin tener ni siquiera en cuenta que, como ya había dicho, contenía las sales minerales esenciales de la carne.

8. EJERCICIO MUSCULAR Y ALIMENTOS NITROGENADOS

Durante siglos se pensó que para realizar trabajos físicos duros y continuados se necesitaban alimentos a base de carne. En el decenio de 1850 se pensaba, siguiendo a Liebig, que durante el ejercicio se consumía la propia sustancia muscular de quien lo realizaba. Por tanto, un trabajo muy duro y sostenido necesitaría consumir energía de la propia musculatura de quien lo realizaba. Para nuestro sabio, tanto las personas como los caballos, para ejercer su trabajo solo requerían proteína y no carbohidratos ni grasa. Según Carpenter (1994), Liebig expuso con claridad sus ideas sobre metabolismo energético en su conocido e influyente libro de *Química Animal*. De él procede la siguiente cita:

“El recambio de alimentos proteicos en los animales adultos, como demuestra la excreción continua de urea, incluso cuando no se consume ninguno de tales materiales, se explica porque los músculos se consumen a sí mismos cuando ejercen su fuerza muscular. Esa fuerza se libera cuando la molécula se rompe en fragmentos.

La ruptura del músculo, que ocurre durante el día, se compensa por la recomposición de los tejidos durante el sueño... Para un adulto activo se necesitan 7 horas. Para un anciano, que es menos activo, solo se requieren 3 y media”

Era tal el prestigio de Liebig, que estas afirmaciones sobre proteínas de la dieta y actividad muscular se aceptaron, sin crítica alguna hasta bien avanzado el último tercio del siglo XIX. Guggenheim (1981)

señala en su libro de *Nutrición y enfermedades nutritivas* que Liebig nunca llevó a cabo experimento fisiológico alguno, ni realizó estudios de balances nitrogenados con animales o personas. De hecho despreciaba a los fisiólogos a quienes creía incapaces de comentar y menos refutar sus cálculos. Por ello muy pocos de sus coetáneos se aventuraban a criticar sus teorías. Entre ellos se encontraba Edward Smith, un médico inglés muy preocupado por los aspectos prácticos de la dieta y singularmente por la cantidad de alimentos que necesitaban los distintos tipos de individuos. Para profundizar en estos aspectos desarrolló en la penitenciaría de Coldbathfields una investigación cuidadosamente planificada y desarrollada sobre la comida que recibían los presos, prestando especial atención a la cantidad de nitrógeno que ingerían con la dieta y a la que excretaban con la orina y heces. Quedó muy sorprendido al comprobar que la cantidad excretada no guardaba relación alguna con el trabajo muscular desarrollado ya que solo dependía del nitrógeno contenido en los alimentos que ingerían. Desgraciadamente sus observaciones apenas tuvieron difusión en el mundo científico británico que, como en el resto del mundo, solo prestaba atención a lo afirmado por Liebig y propagado por sus discípulos.

Hubo que esperar a 1889 para comprender, demostrar y admitir, sin ninguna sombra de duda, que Liebig estaba equivocado y que la razón estaba con Smith: (Tananhill, 1973). Dos científicos de Zürich, el fisiólogo Adolf Fick y el químico Johannes Wislicenus realizaron un experimento muy sencillo que consistió en escalar el monte Faulhorn, de 1970 m de altitud, con una dieta de la que excluyeron todo alimento que llevase nitrógeno. Midiendo su nitrógeno urinario comprobaron que, durante la ascensión al Faulhorn e inmediatamente después de realizada, no excretaban más nitrógeno que cuando descansaban plácidamente, lo que indicaba que la proteína consumida durante la ascensión no era suficiente para proporcionar toda la energía requerida. Para ello y de acuerdo con los conocimientos actuales, el músculo funciona como una máquina que oxidando la glucosa lleva a cabo su trabajo gracias a la energía liberada en su oxidación.

Las opiniones de Liebig sobre el trabajo muscular que, como demostraron Fick y Wislicenus estaban equivocadas, posiblemente

contribuyeron a popularizar la creencia de que la carne es un alimento esencial para reparar y mantener en buen estado el tejido muscular. De aquí que, hasta muy recientemente, se haya recomendado y llevado a la práctica la alimentación de los atletas de alta competición con grandes cantidades de carne poco hecha. (Grande Covián, 1993).

9. VALORACIÓN DE LAS DIETAS HUMANAS

Los clásicos trabajos de Liebig permitieron contar con un método científico de evaluación cuantitativa del valor nutritivo de las dietas. Ello fue posible gracias a las mejoras que introdujo, junto con sus colaboradores, en el análisis químico general y en el de los alimentos en particular. Esto permitió determinar con exactitud y fiabilidad el carbono y el nitrógeno que pierde cada 24 horas el organismo con la respiración y con la excreción fecal-urinaria respectivamente. Los análisis que realizaron de una serie de mezclas alimenticias distintas servirían para aportar las cantidades perdidas de carbono y de nitrógeno; conviene recordar que las cifras o resultados de las determinaciones del carbono eran consideradas como la medida del valor calórico de los alimentos, mientras que las correspondientes del nitrógeno eran la medida de su valor como alimentos formadores de tejidos. Durante muchos años se prestó especial atención al contenido de carbono y de nitrógeno de los alimentos y de la dieta.

Que la escuela de Liebig la que hizo los primeros intentos de establecer los requerimientos o necesidades nutritivas humanas, algo que, por motivos obvios, estaba todavía lejos de lograrse. En una conferencia dictada por Lyon Playfair en la *Royal Institution* en 1853, revisó todos estos aspectos y puso de manifiesto lo poco que realmente se sabía sobre necesidades nutritivas. Mostró un gran número de análisis y cálculos de las cantidades de alimentos carbonados y nitrogenados que consumían normalmente las personas pero añadiendo que “desearíamos datos verdaderamente fiables que mostrasen las cantidades exactas y reales de carbono y nitrógeno indispensables para la conservación de la salud bajo distintas circunstancias” (Drummond y Wilbraham, 1958).

Lo que sí pusieron de manifiesto estos trabajos fue la inutilidad de emplear como índice de valoración de las dietas a la cantidad total de

alimentos consumidos, ignorando por completo su composición química, tal y como hacían los métodos anteriores a Liebig. La única contribución de estos trabajos a la nutrición fue señalar la cantidad total de alimentos que, como media, consumían los distintos estamentos sociales y las proporciones relativas que aquellos contenían de fibrina (esto es, proteína), grasa, materias carbonadas (o alimentos amiláceos) y sales.

10. LACTANCIA ARTIFICIAL

Las investigaciones de Liebig en química de los alimentos influyeron directa e indirectamente en la lactancia artificial de los niños. Directamente porque él mismo ideó y permitió la puesta en el mercado de un alimento infantil patentado como sustituto de la leche materna, e indirectamente por la difusión de sus nuevas ideas sobre necesidades nutritivas de carbono, nitrógeno y otros principios.

Fue el primero en señalar que los sustitutos de la leche materna deberían parecerse a ella en composición química cuanto fuera posible e insistió en la importancia de los compuestos nitrogenados para la construcción de los tejidos de los niños y animales en crecimiento. A este respecto escribía (1867):

“La deficiencia de elementos productores de calor puede suplirse con un suplemento de ingredientes productores de sangre; pero entonces este suplemento pierde su capacidad de aumentar el peso corporal. Los elementos productores de calor son incapaces de producir sangre; si el suplemento sobrepasa la proporción necesaria, pierde eficacia”

Con estas ideas *in mente* ideó la fórmula de un alimento infantil que él creía “perfecto”. Se trataba de una mezcla de harina de malta, cocida con un poco de bicarbonato potásico que se añadía para disminuir la acidez de las harinas de trigo y de malta. La leche o alimento infantil de Liebig era un producto patentado que se comercializaba como *Liebig's Infant Food* (Alimento Infantil de Liebig).

En un principio se vendía en forma líquida y a un precio ligeramente superior al de la leche de vaca. Más tarde, cuando sus cifras de venta se alejaron mucho de las que deseaban los fabricantes, se

sustituyó el producto original por una preparación farinosa del mismo tipo pero con menor cantidad de leche y algo de harina de guisantes. Sus ventas fracasaron nuevamente.

Los comentarios negativos de algunos médicos, que llegaron a calificar al producto de indigestible y a publicar que dudaban que fuese realmente una copia o análogo de la leche, hirieron profundamente a Liebig cuyo carácter irritable se vislumbra en la respuesta que dio a estas críticas (1867). Dice a este respecto:

“Por ejemplo, si se dijera que este preparado no es conveniente para los recién nacidos, tal afirmación no podría mantenerse basándose en razones teóricas, dado que en el alimento que ingieren se encuentran los mismos ingredientes que en la leche materna. Consecuentemente, si esta leche les conviene, no comprendo por qué han de ser incapaces de digerir el Alimento Infantil de Liebig”

A pesar del fracaso comercial, en los 20 años siguientes fueron muchas las empresas que pusieron en el mercado productos parecidos al de Liebig. Muchos de ellos se componían de harina, almidón, harina de malta y productos similares y fueron responsables de bastantes cuadros patológicos y de malnutrición infantil, ya que, además de deficientes en proteína y grasa, lo eran también en vitaminas, nutrientes entonces desconocidos.

Los niños de las clases altas eran los más afectados por el consumo de estos preparados puesto que su precio los convertía en inalcanzables para los de las clases bajas.

Aunque se consumían con frecuencia mezclados con cierta cantidad de leche, el desarrollo de los lactantes que los consumían habitualmente dejaba bastante que desear: A los 2-3 años solían presentar sobrepeso, gran palidez y a menudo debilidad y dejadez. Casi todos padecían un raquitismo larvado que no se diagnosticaba.

11. IDEAS SOBRE FERMENTACIONES Y PUTREFACCIONES

Schwann, en 1837, además de refrendar los experimentos de Spallanzani sobre la falsedad de la generación espontánea, puso de manifiesto que la putrefacción era consecuencia del crecimiento de ciertos organismos que aprovechaban los compuestos orgánicos de los alimentos. Describió, asimismo, la fermentación alcohólica que creyó se debía, muy probablemente, a un organismo vivo (lo que se conocería después como levadura) que era el responsable de la producción de alcohol y que posiblemente contenía nitrógeno. De hecho afirmó que “la producción de alcohol y la aparición del hongo del azúcar” acaecían conjuntamente. Como se ve Schwann fue un adelantado de su tiempo, muchas de cuyas ideas no comprendían sus coetáneos.

Como señala Brock (1961), Liebig negó que los organismos vivos produjesen alcohol. Casi a la vez que Schwann pero independientemente, Cagniard-Latour (1938) publicó su memoria sobre la fermentación vínica, en la que describe el aspecto al microscopio de la levadura de cerveza y en cuyo resumen afirma que “solo descompone el azúcar cuando está viva” y concluye que “es muy probable que la producción de dióxido de carbono y la descomposición del azúcar y su conversión en alcohol sean consecuencia de su crecimiento”.

Por su parte Liebig, en un extenso artículo publicado en 1839 y en el que apenas hay trabajo experimental, apoyándose en ideas preconcebidas y contrarias a los resultados de los microbiólogos (Schwann, Cagniard-Latour y Pasteur), llega a conclusiones completamente distintas e incluso afirma que “ciertas perturbaciones o cambios en: (a) el calor, (b) el contacto con distintas sustancias y (c) la influencia de alguna sustancia que esté experimentando un cambio, son responsables de la descomposición”. Liebig, que, sin ningún género de dudas, fue el químico más sobresaliente del siglo XIX, estaba convencido de que todas las actividades vitales podían explicarse en términos físicos y químicos. Una gran parte de los conocimientos bioquímicos actuales se originaron a partir de los de Liebig y sus discípulos, sin embargo, sus puntos de vista sobre la putrefacción posiblemente retrasaron algunos años el reconocimiento como ciencia de la Microbiología (Brock, 1961).

Pasteur describió en 1857 los resultados de sus primeros trabajos sobre la fermentación láctica que contradecían lo defendido por Liebig;

esto dio lugar a una polémica que duró varios años y terminó a favor del microbiólogo francés al demostrar en su memoria sobre la fermentación alcohólica, publicada en 1860, que se debía a un “organismo vivo” (una levadura) cuya morfología estudió durante todo su ciclo vital, después de separarlo del caldo de fermentación y lavarlo simplemente con agua.

12. A MODO DE RESUMEN

Liebig fue un químico genial, un excelente maestro y un trabajador infatigable. Sentó las bases del gran desarrollo experimentado por la química, cuyas leyes y principios aplicó a la agricultura, la fisiología y la nutrición, e intentó explicar también en términos químicos otros fenómenos biológicos. Su originalidad y contribución al acervo científico se refleja en sus libros *Química Orgánica y sus aplicaciones a la agricultura y la fisiología* (1840) y *Química Orgánica en su aplicación a la fisiología* (1842), en los más de doscientos artículos publicados en sus *Cartas familiares de Química* y en sus informes, clases y conferencias que marcarían para siempre a sus discípulos, muchos de los cuales serían, a su vez, grandes docentes e investigadores. Fue además, un excelente escritor y publicista y un buen comunicador y divulgador de la ciencia.

Sus más destacadas contribuciones a la nutrición fueron:

1. Que el carbono y el hidrógeno, que se oxidan en el proceso respiratorio forman parte, de los tres componentes orgánicos fundamentales de la materia viva: Carbohidratos, grasas y proteínas.
2. Que las oxidaciones de estos compuestos acaecen no solo en los pulmones, como pensaba Lavoisier, sino también en todas las células del cuerpo.
3. Que los alimentos se dividen en *respiratorios* (ahora los llamaríamos energéticos) que son los que sirven de combustible y proporcionan energía y en *plásticos*, cuyo papel – además de servir de combustibles- es formar parte de las propias estructuras corporales.
4. Sus intentos de establecer los requerimientos o necesidades nutritivas humanas.

Por todo ello el barón Justus Von Liebig ha sido considerado con razón uno de los más destacados fundadores de las Ciencias Nutritivas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CARNIARD-LATOUR, CH. (1838) Mémoire sur la fermentation vineuse. *Annales de Chimie et de Physique*, 68, 206-222.
- (2) BERL, E., (1938) Justus Liebig. May 14, 1803-April 18, 1873. *J. Chem. Ed.*, 15, 553-562
- (3) CARPENTER, K. J., (1994) Protein and Energy: A Study of Changing Ideas in Nutrition. Cambridge University Press. London
- (4) DRUMMOND, J.C Y WILBRAHAM, A., (1958) *The Englishman's Food*. Jonathan Cape. London.
- (5) GRANDE COVIÁN, F., (1993) Introducción histórica al descubrimiento del papel de la energía y de los nutrientes en la alimentación del hombre. En "Aspectos de la Nutrición del hombre". Fundación BBV. Bilbao
- (6) GUGGENHEIM, K.Y., (1981) Nutrition and Nutritional Diseases. Collamore Press. Lexington, Massachusetts, USA.
- (7) KREUZ, C.L., LANZER, E.A Y PARÍS, Q., (1995) Funções de produção von Liebig com rendimentos decrescentes. *Rev. Pesq. Agropec. Brasil.*, 30, 1, 1995
- (8) LIEBIG, J. VON. (1839) Ueber die Erscheinungen der Gährung, Fäulnis und Verwesung und ihre Ursachen. *Annalen der Physik und Chemie*, 48, 106-150
- (9) LIEBIG, J. VON., (1842) Animal Chemistry or Organic Chemistry in its application to Physiology and Pathology. Edición, a partir de un manuscrito del autor, dirigida por William Gregory, London.
- (10) LIEBIG, J.VON., (1858). Familiar Letters on Chemistry. 4th Ed., citado por Drummond y Wilbraham 1958.
- (11) LIEBIG, J.VON., (1867). A Food for Infants. Citado por Drummond y Wilbraham, 1958.
- (12) OSLER, SIR W., (1929). Biographical Essay on W. Beaumont. 13th International Physiological Congress. Boston, USA
- (13) PARTINTONG, J.R., (1964) A History of Chemistry. Vol. 4, págs. 294-317. Macmillan, London.
- (14) PASTEUR, L. (1857) Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Comptes rendus des séances de L'Académie des Sciences*, 45, 913-916.
- (15) PASTEUR, L. (1860) Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Chimie et de Physique*, 58, Ser. 31, 323-326

- (16) PAVY, F.W., (1867) Digestion, its Disorders and Treatment.
- (17) SANZ, B., (1988) El ayer, hoy y mañana de la Bromatología. Discurso de ingreso como Académico de Número de la Real Academia de Farmacia. Farmacia, 11. Madrid.
- (18) TANANHILL, R., (1973) Food in History. Stein and Day. New York
- (19) TWIGG, C.A Y TWIGG, M.V., (1973) Centenary of the Death of Justus Von Liebig. *J. Chem. Ed.*, 50, 273-274
- (20) SCHWANN, T. (1837) Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulnis. *Annalen der Physik und Chemie*, 41, 184-193

Liebig et la Pharmacie

WOLF-DIETER MÜLLER-JAHNCKE*, ET CHRISTOPH
FRIEDRICH**

Justus von Liebig (1803–1873) né le 12 mai 1803 compte parmi les plus grands chimistes allemands. « Père de la chimie organique », pionnier de la chimie agricole et créateur de « l'extrait de viande » légendaire, il devint particulièrement célèbre. Une célébrité qui se reflète dans la multitude d'écrits consacrés à sa vie et son travail. À part les biographies détaillées (1-3), il existe également plusieurs recueils de lettres (4-6). Il paraît donc étonnant que Liebig qui par moments travaillait dans une pharmacie, était considéré si peu dans l'historiographie de la pharmacie (7). Ce texte regarde de plus près sa relation avec la pharmacie.

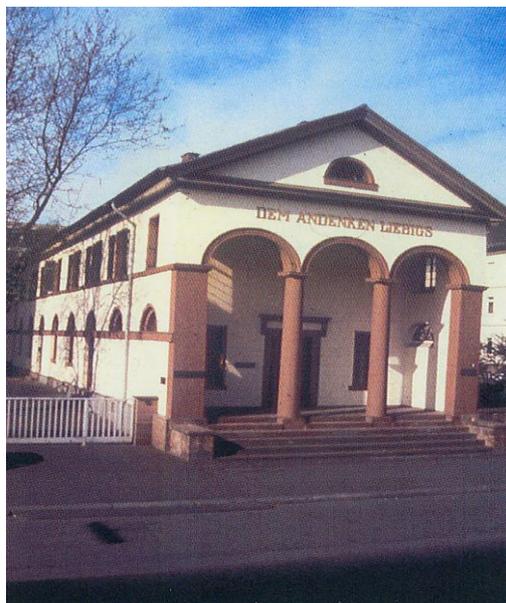


FIGURA 12.- Edificio del laboratorio de Liebig en Giessen

* Académico Correspondiente. Profesor en la Universidad de Heidelberg

** Profesor en la Universidad de Marburg

I. L'APPRENTISSAGE DE PHARMACIEN

En septembre 1817, Justus Liebig qui en tant que fils d'un marchand de couleurs et commerçant à Darmstadt a montré depuis son enfance sa prédilection pour la chimie, commença son apprentissage dans la pharmacie à Heppenheim sur la route allemande des montagnes. Depuis 1792 le pharmacien Christoph Pirsch dirigea la pharmacie fondée en 1784. Son fils Gottfried Pirsch (1792–1850), qui prit la direction de la pharmacie en 1816, avait fréquenté l'Institut privée de pharmacie de Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837) à Erfurt de 1815 à 1816 et avait passé son examen de pharmacien en automne 1816 à Darmstadt. En 1822 Gottfried Pirsch devint maire de Heppenheim.

Dans son autobiographie Liebig constate que son apprentissage de pharmacien le fatiguait déjà après dix mois et que pour cette raison, son maître le renvoya chez lui. Cette constatation fait croire que son intérêt pour la pharmacie avait vite diminué. Les lettres adressées à ses parents montrent pourtant que l'apprentissage lui plaisait beaucoup. Après un mois il écrivit à sa famille: « Je travaille à la satisfaction de mon maître ce qui me réjouit beaucoup », et six mois après il leur confia: « Monsieur Pirsch est assez aimable et je suis toujours content ». En juin 1818 pourtant, Pirsch le renvoya chez son père. Il existe différentes versions sur les raisons qui vinrent en partie de Liebig lui-même. Encore bien plus tard, celui-ci se gênait probablement du fait que son père n'avait plus été en mesure de payer les frais d'apprentissage. Dans son autobiographie il souligna tout de même l'utilité de cet apprentissage: « Les dix mois étaient suffisants pour me donner une connaissance complète de mille choses différentes qui existent dans une pharmacie ainsi que leur utilisation et leurs applications multiples »(2).

II. LES ETUDES

En 1820, Justus Liebig commença ses études en chimie chez Karl Wilhelm Gottlob Kastner (1783–1857) à l'université de Bonn. Kastner, qui était né fils d'un théologien à Greifenberg en Poméranie, avait com-

mencé sa formation scientifique dans la pharmacie de Swinemünde en 1798 (9). Pendant sa formation, Kastner fit des recherches intenses, réalisa ses propres essais chimiques et rédigea, comme il disait à Trommsdorff, les premiers articles scientifiques « à la lumière d'une lampe accrochée loin de la table de la pharmacie, après exécution du travail du jour amer », articles qu'il publia dans le « Journal » de celui-ci (10). Il paraît donc tout à fait naturel que le maître de Liebig, Gottfried Pirsch en tant qu'élève de Trommsdorff lui avait recommandé les études chez Kastner, ancien pharmacien et ami de Trommsdorff.

Kastner encourageait particulièrement Liebig et celui-ci était très attaché à son maître et le suivit à Erlangen en 1821. Plus tard, le jugement de Liebig sur son ancien maître est pourtant moins positif, lorsqu'il remarque dans ses notes autobiographiques: « Le discours de Kastner qui était considéré comme le chimiste le plus célèbre, était sans ordre, sans logique et ressemblait à la boutique de fripier pleine de connaissances que je portais dans ma tête »(3).

En 1822, Liebig continua ses études à Paris sur la recommandation de Kastner. C'est ici, qu'il connut une nouvelle forme de la chimie, comme il souligne dans son autobiographie: « Les discours de Gay-Lussac, Thénard, Dulong etc. avaient pour moi un charme au-delà de toute expression; l'introduction dans la méthode astronomique ou mathématique de la chimie [...] a conduit les chimistes et physiciens français à faire leurs grandes découvertes » (11, p. 14). Cette forme de la recherche chimique se distinguait fortement de celle pratiquée en Allemagne. Le fait que Liebig se dédit plus tard de son ancien maître Kastner ne peut pas être considéré comme une preuve d'ingratitude. Ce refus est plutôt lié à son aliénation de l'orientation vers la philosophie naturelle favorisée par Kastner. Quoique Kastner, dans sa qualité d'ancien pharmacien, avait publié de nombreux résultats bien précieux de recherches expérimentales, il succomba comme beaucoup de naturalistes de son époque à la fascination de la philosophie naturelle. Il est impossible de dire à quel point l'attaque de Liebig contre la philosophie naturelle était aussi une « métaphore de son aversion contre l'homosexualité » et ainsi donc une désolidarisation du poète August Graf von Platen (1796–1835) qui lui avait été proche pendant son séjour à Erlangen (3).

Les biographies de Liebig prêtent peu d'attention au fait que la chimie à Paris était essentiellement formée par les pharmaciens qui mettaient leurs expériences expérimentales gagnées dans les laboratoires pharmaceutiques au service de la chimie moderne. Quoique Joseph-Louis Gay-Lussac (1778–1850), le « chef » de la chimie française de l'époque n'était pas du métier de pharmacien, de nombreux pharmaciens travaillaient dans son laboratoire et Louis Jacques Thénard (1777-1857), mentionné dans la citation ci-dessus, avait commencé sa formation dans une officine. La carrière de Liebig a donc subi non seulement une influence décisive de la part des pharmaciens, mais le fait de se tourner vers la recherche chimique expérimentale exacte ressemble à l'approche de beaucoup d'autres pharmaciens de l'époque qui faisaient des recherches dans le domaine chimique. Ses recherches intenses à Paris et son talent exceptionnel l'ont bien vite mené à surpasser le niveau de la plupart des chimistes allemands dont un bon nombre venait du métier de pharmacien.

III. PROFESSEUR DE FACULTÉ À GIESSEN

Le 16 mai 1824, Justus Liebig fut nommé professeur extraordinaire à l'université de Giessen, après que l'université d'Erlangen lui avait conféré, avec le soutien de Kastner, un diplôme de doctorat en juin 1823. À Giessen Liebig fut nommé professeur ordinaire en décembre 1825 et fonda un Institut chimique moderne où les cours de chimie étaient donnés sous de nouveaux aspects, c'est-à-dire dans une unité de cours (de laboratoire) théoriques et pratiques.

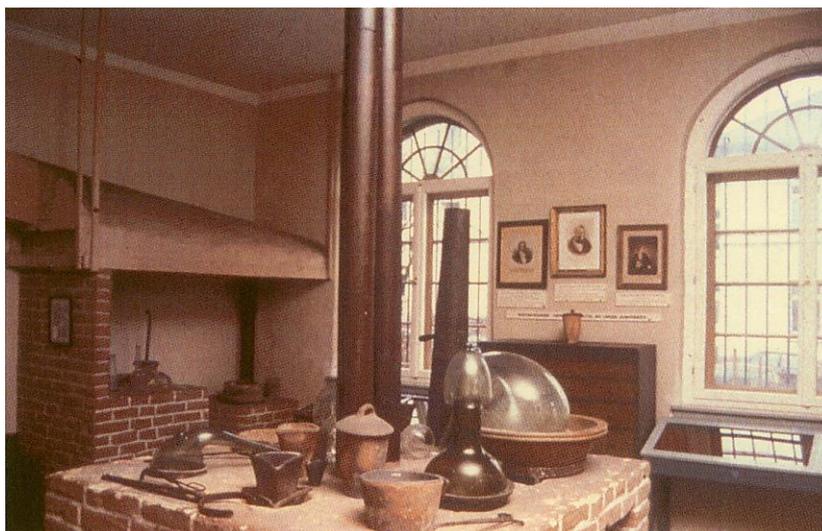


FIGURA 13.- Interior del laboratorio tal y como se conserva hoy en día

Liebig est souvent appelé le « créateur » des études de chimie modernes alors que lui-même a toujours accordé ce mérite à ceux qu'il prit pour exemple. En dehors de ces chimistes français, il pensait surtout à Johann Bartholomäus Trommsdorff, qui avait ouvert un institut pharmaceutique privé à Erfurt en 1795. Le 20 janvier 1828, Liebig écrivit à Trommsdorff: « Par votre activité infatigable vous avez donné une formation purement scientifique à une profession dont l'importance était autrefois sous-estimée. Vous l'avez élevé à un niveau en Allemagne qui est sans égal dans les autres pays. Par la fondation d'un institut purement chimique j'ai essayé de propager la chimie en particulier pour les futurs professeurs d'école et les autres métiers et je suis heureux que cette activité aie trouvé votre accord »(12).

En 1825, Liebig informa le ministère de la Hesse à Darmstadt qu'il désirait fonder un institut chimique et pharmaceutique à l'université en collaboration avec les professeur de minéralogie Friedrich Wernekingk (1798-1835) et professeur de mathématiques Hermann Umpfenbach (1798-1862) (11). La majorité du sénat de l'université de Giessen refusa cette idée. Dans son vote, un membre souligna particulièrement, qu'il

était bien le devoir de l'état de former ses fonctionnaires, mais que ceci ne s'appliquait pas aux « pharmaciens, savonniers, brasseurs, fabricants de liqueurs, aux teinturiers, vinaigreriers, droguistes et aux épiciers » (13, p. 91).

Liebig et ses deux collègues fondèrent donc en privé – à l'exemple des instituts privés fondés par des pharmaciens – une « Ecole pharmaceutique et technique ». Ils soulignèrent formellement que « les connaissances que le futur pharmacien acquiert pendant les années de formation à l'officine, n'étaient point suffisantes », mais que celui-ci devrait plutôt scrupuleusement étudier les sciences et la chimie (14).

Il n'est donc pas étonnant que pendant les premières années le nombre d'étudiants en pharmacie était largement supérieur à celui des étudiants en chimie. En 1830 et 1835, 15 étudiants seulement étaient immatriculés en chimie, mais 53 étaient étudiants en pharmacie. Pendant que le nombre d'étudiants en chimie augmentait considérablement surtout après 1840, le nombre d'étudiants en pharmacie resta à peu près au même niveau. Pendant « l'ère Liebig », 252 pharmaciens en tout ont suivi leur formation à Giessen. (3, p. 57) Parmi ceux-ci se trouvèrent entre autres Wilhelm Mettenheimer (1802-1864) qui, après avoir fait son doctorat chez Liebig en 1827, représenta la pharmacognosie à Giessen à partir de 1830, et Theodor Marsson (1816-1892) qui plus tard s'est fait un nom en tant que botaniste. Et le fabricant pharmaceutique et fils de Heinrich Emanuel Mercks (1794–1855), Georg Merck (1825–1873) lui aussi faisait partie des élèves de Liebig. En 1848, Liebig chargea Georg Merck à Giessen d'analyser les résidus de l'opium. Il y trouva un nouvel alcaloïde qu'il appela papavérine. (15,16).

IV. LIEBIG, VERIFIEUR DE PHARMACIE

Quoique Liebig n'était pas pharmacien, le ministère de l'intérieur et de la justice du grand-duché de la Hesse à Darmstadt le chargea le 9 octobre 1827 d'effectuer des révisions de pharmacies. Une ordonnance indiquait à ce sujet: « Comme certaines choses ont été portées à notre connaissance qui nécessitent une vérification exceptionnelle des pharma-

cies en province de haute Hesse, nous vous donnons l'ordre d'exécuter cette tâche avec le concours de médecins physiologiques correspondants de sorte que vos cours académiques ne connaissent aucun dérangement »(17). La faculté de médecine de l'université de Giessen qui se sentait oubliée, prononça des doutes quant à la qualification de Liebig. On souligna que Liebig serait seulement qualifié pour faire des analyses de préparations chimiques, mais qu'il ne maîtrisait pas suffisamment « la connaissance beaucoup plus importante des marchandises surtout dans le domaine de l'histoire naturelle et de la botanique de l'art pharmacien ». Le ministère de la Hesse renvoya dans sa réponse au professeur à Göttingen Friedrich Stromeyer (1776-1835), qui effectuait, lui aussi, des révisions de pharmacies dans le royaume de Hanovre sans pourtant être pharmacien. En même temps le ministère souligna que l'on souhaitait expressément faire effectuer des vérifications de pharmacies dans une « relation chimique ». Jusqu'au début du semestre d'hiver 1828/29, Liebig effectua douze vérifications de pharmacie. En février 1830, Liebig demanda d'être libéré de ses fonctions de vérificateur de pharmacies à cause de sa santé et de ses tâches multiples. Son élève Mettenheimer prit sa place, mais en mai 1831 Liebig était sollicité à nouveau pour faire une vérification.

Quoique les vérifications représentaient une source de revenus supplémentaire pour Liebig, il n'effectua plus de révisions après 1831. Les six procès-verbaux conservés jusqu'aujourd'hui contiennent un bon nombre de réclamations concernant la pureté des préparations et l'intégralité des médicaments ainsi que l'utilité des balances et des poids. Suite à la plainte d'un pharmacien à qui Liebig avait attesté des connaissances insuffisantes, celui-ci se voyait refusé le droit d'examiner les pharmaciens et son ordonnance était réduit à l'examen de l'état des pharmacies (17).

V. LIEBIG ET LES « ANNALES DE LA PHARMACIE »

En 1831, Liebig devint coéditeur du « Magazine de pharmacie ». Cette revue avait été fondée en 1822 par Georg Friedrich Hänle (1763–1824) pour servir de pendant à la revue de Brandes « Archive de

l'association des pharmaciens » avec le titre « Magazine pour les nouvelles expériences, découvertes et corrections dans le monde de la pharmacie en tenant compte de l'examen physiologique et de l'utilisation des médicaments éprouvés dans la pratique, et en considération de l'utilisation de médicaments récemment découverts dans la thérapie » (18). Le périodique avait pour but de donner accès aux informations de l'association pharmaceutique du Baden à ses membres. Après la mort de Hänle en 1824, Philipp Lorenz Geiger (1785-1836) devint éditeur du « Magazine » (19). Geiger, qui enseignait comme maître de conférences à l'université de Heidelberg depuis 1818, avait fait la connaissance de Liebig en 1825 à Francfort sur Main à l'occasion de la réunion de la société des naturalistes et médecins allemands (20). En 1830 ils eurent un contact plus étroit à la réunion de la société des naturalistes et médecins allemands à Hambourg. Lors de cette réunion les participants fondèrent un département pharmaceutique et chimique et élurent Trommsdorff président de ce département (21,22). Geiger, qui dirigea l'intérêt de Liebig vers les alcaloïdes, s'occupa de l'édition du « Magazine » avec le plus grand soin, mais il considéra ce travail de plus en plus comme une charge (20). Selon W. Brock, Geiger se voyait également emmené par la pénurie d'argent que Liebig connaissait dans le temps, de le prévoir comme coéditeur (3).

Le 3 juillet 1831, Geiger raconta à Trommsdorff: « La pièce jointe te montre que je me suis associé avec l'ami Liebig pour le magazine. Mes affaires trop encombrantes ne me permettent pas de continuer à faire la rédaction tout seul et j'espère que le journal y gagnera. » (23).

Quoique Liebig et Geiger ne modifièrent point la structure et l'étendue de la revue, le magazine devait paraître plus souvent et contenir plus d'articles grâce à une impression plus serrée. Geiger avait toujours examiné les travaux envoyés au journal avec un sens critique et il les avait corrigé du point de vue expérimental, mais avec l'arrivée de Liebig dans la rédaction il espéra pouvoir renforcer cette « critique expérimentale ». Liebig, qui n'était pas prêt à faire des compromis et qui possédait un style plein d'élan, donna donc bientôt un autre caractère à la revue (20, p. 348-350).

Depuis 1825, on déplorait le nombre trop important de revues pharmaceutiques ce qui amena Liebig, Geiger et Rudolph Brandes (1795-

1842) de fusionner le « Magazine » avec les « Archives de l'association des pharmaciens dans le nord de l'Allemagne ». Tandis que le comptage des deux revues continuait, le nouveau journal issu de la fusion fut appelé « Annales de la pharmacie ».

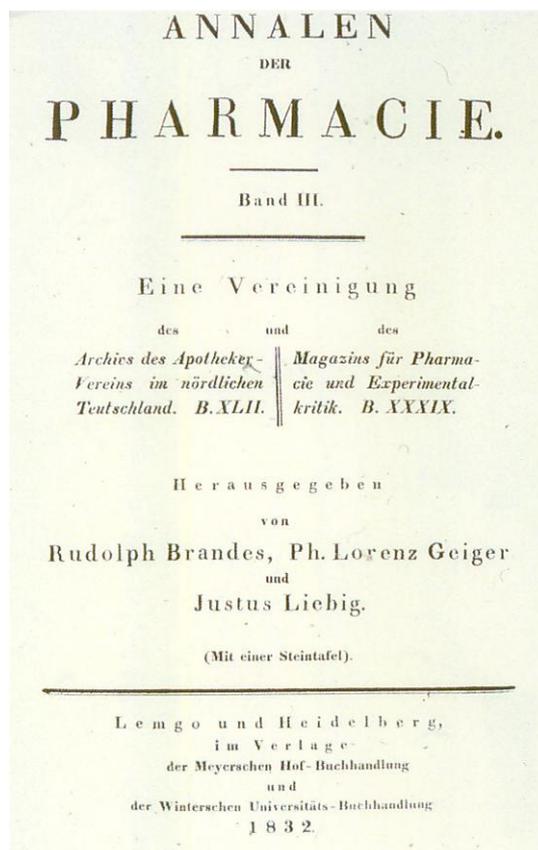


FIGURA 14.- Portada de la revista « Annalen der Pharmacie », editada desde 1832 por Brandes, Geiger y Liebig

Ce journal fut édité en commun par Brandes, Geiger et Liebig à partir de 1832. Avec les « Annales », les éditeurs voulaient contribuer davantage à une plus forte orientation scientifique de la pharmacie. Ceci demandait un choix méticuleux des articles à publier « pour que seuls ce

qui est véritablement de valeur aie une place dans le journal et que tout ce qui est inutile en soit exclu » (20 p. 356). Le magazine parut une fois par mois sous forme d'un tome qui unissait trois revues.

Brandes, qui depuis 1820 était à la tête de « l'association des pharmaciens dans le nord de l'Allemagne » dans la fonction de premier directeur, compte parmi les pharmaciens d'officine engagés dans les sciences, mais la coopération avec Liebig s'avéra de plus en plus difficile (24). Lorsque Trommsdorff annonça en 1834, qu'il ne souhaitait plus continuer à éditer son « Nouveau journal de pharmacie », Geiger et Liebig lui demandèrent de leur permettre de placer son nom devant leur journal pour publier désormais les Annales comme une union de trois magazines. Comme Trommsdorff hésita d'abord, Geiger lui expliqua dans une lettre les idées que Liebig et lui avaient pour le journal. Trommsdorff donna finalement son accord ce qui étonna beaucoup Brandes qui n'avait pas été informé ni par Liebig ni par Geiger (23).

En 1835, les relations entre Liebig et Brandes furent rompues définitivement et Brandes recommença à éditer seul son magazine avec le titre « Archives de l'association des pharmaciens dans le nord de l'Allemagne » (25). Quoique Brandes et Geiger firent seulement allusion aux raisons de la rupture dans leurs lettres à Trommsdorff, Liebig trouva des mots bien plus clairs: « Brandes est incapable et inapte à la rédaction d'un journal [...] Un tel homme ne peut pas être l'organe d'une science, car il est le représentant de la platitude et des connaissances superficielles » (26).

Brandes avait proposé d'orienter les « Annales » davantage vers la chimie tandis que les « Archives » devaient se limiter aux sujets pharmaceutiques (20, p. 359). Pendant les années suivantes, beaucoup de chimistes célèbres comptèrent parmi les auteurs publiant des articles dans les « Annales » tels que Friedrich Wöhler (1800–1882), Eilhard Mitscherlich (1794–1863), Jöns Jacob Berzelius (1779–1848) et Gay-Lussac. Après la mort de Geiger, Heinrich Emanuel Merck (1794–1855), avec qui Liebig entretenait des relations amicales, prit sa place dans la rédaction pour peu de temps. Liebig tenait à avoir un coéditeur pharmacien. Il avait déclaré clairement: « la tendance primordiale des Annales reste inaltérablement la pharmacie pure, et toutes les branches de celle-ci forment sa base » (20, p.

364). En 1836, le pharmacien Friedrich Mohr (1806–1879) devint coéditeur, mais il se désista déjà en 1838, brusqué par la décision de Liebig de publier les « Annales » en trois langues en collaboration avec Jean Baptiste André Dumas (1800–1884), professeur à la Sorbonne à Paris et Thomas Graham (1805–1869), professeur en chimie à Londres. À partir de 1838, Woehler fit partie de la rédaction et le journal se transforma en un magazine plutôt chimique. De ce fait il fut publié sous le titre « Annales de la chimie et de la pharmacie » à partir de 1840 (25). C'est après la mort de Liebig seulement que le titre fut de nouveau changé en « Les annales de la chimie de Justus Liebig ».

VI. SYNTHÈSE

Les lignes ci-dessus ont montré la diversité des relations de Liebig avec la pharmacie. Un grand nombre de pharmaciens a participé à sa formation. En dehors de son apprentissage de pharmacien, c'est surtout Kastner qui exerça une grande influence sur lui, qui le soutint et qui dirigea ses pas vers la France où encore une fois de nombreux pharmaciens exercèrent une influence sur Liebig.

Liebig lui-même fonda un institut pharmaceutique privée, assura la formation de plus de 250 pharmaciens à Giessen et eut une part considérable dans la formation d'une génération de pharmaciens ayant suivi des études scientifiques. Sa méthodique d'enseignement se référait en particulier à l'exemple de Trommsdorff dont il n'arrêtait pas de souligner la contribution.

En tant que réviseur de pharmacie et éditeur d'un journal conçu tout d'abord comme une revue pharmaceutique, Liebig a apporté une contribution importante à la scientification de la pharmacie. Son jugement mordant sur Brandes élucide le fossé entre la chimie professionnelle de l'université et les recherches d'amateurs réalisées par les pharmaciens d'officines. Le fait que la pharmacie fut si longtemps gardée dans le titre des « Annales » montre bien que Liebig ne voulait point perdre les pharmaciens parmi les abonnés ou laisser tomber les termes de problèmes pharmaceutiques et techniques. Comme bien d'autres chimistes de son

époque, il se tourna avec enthousiasme vers le nouveau domaine de la chimie des alcaloïdes (8) et des recherches sur d'autres médicaments tels que la salicine (27).

Finalement le savoir-faire exceptionnel de Liebig quant à soulever les sujets de recherche importants à la pratique – par exemple ses recherches sur l'engrais artificiel et son extrait de viande –, qu'il fut par moments intéressé d'exploiter, rappelle son passé pharmaceutique. Beaucoup de pharmaciens du 18^{ème} et 19^{ème} siècle avaient mené avec succès de telles recherches avec un engagement pour « l'utilitarisme ». Liebig se distingua ainsi de bien d'autres chimistes de son époque qui sentirent une obligation envers les « sciences pures » et montrèrent peu d'intérêt pour la recherche de sciences appliquées. Il semble donc bien évident que Liebig doive cette orientation à son contact étroit avec la pharmacie.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) VOLHARD, J., (1919) Justus von Liebig. 2 tomes, Leipzig.
- (2) BLUNCK, R., (1946) Justus von Liebig. Hamburg.
- (3) BROCK, W. H., (1999) Justus von Liebig. Eine Biographie des großen Wissenschaftlers und Europäers. Braunschweig, Wiesbaden.
- (4) CARRIERÈ, J. (Hrsg.) (1893), Berzelius-Liebig. Ihre Briefe von 1831 bis 1845. München, Leipzig.
- (5) HOFFMANN, A.W. VON (Hrsg.) (1888), Briefwechsel zwischen Liebig und Wöhler. 2 tomes Braunschweig.
- (6) KAHLBAUM, G.W. A. (Hrsg.) (1904), Justus von Liebig und Friedrich Mohr in ihren Briefen von 1834–1870. Leipzig.
- (7) BRAND, K., (1931) Der Einfluß von Justus von Liebig auf die Entwicklung der pharmazeutischen Chemie. *Archiv der Pharmazie* 269, 477–505.
- (8) PAOLINI, C., (1968) Justus von Liebig. Eine Bibliographie sämtlicher Veröffentlichungen mit biographischen Anmerkungen. Heidelberg.
- (9) KIRSCHKE, M., (2001) Liebigs Lehrer Karl W. G. Kastner (1783–1857). Eine Professorenkarriere in Zeiten naturwissenschaftlichen Umbruchs. Berlin, Diepholz.

- (10) Échange de lettres entre Kastner et Trommsdorff. Dans: Friedrich, Ch., Bettin, H., Götz, W. (Hrsg.), *Der Briefwechsel von Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837)*. Acta Historica Leopoldina 18/5. Lieferung, Halle 2000, p. 2006–2013.
- (11) DECHEND, H. VON, (1953) *Justus von Liebig in eigenen Zeugnissen und solchen seiner Zeitgenossen*. Weinheim.
- (12) Échange de lettres entre Liebig et Trommsdorff. Dans: Bettin, H., Friedrich, Ch., Götz, W. (Hrsg.), *Der Briefwechsel von Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837)*. Acta Historica Leopoldina 18/6. Lieferung, Halle 2002, p. 138–168.
- (13) POHL, D., (1972) *Zur Geschichte der pharmazeutischen Privatinstitute in Deutschland von 1779 bis 1873*. Diss. Universität Marburg, p. 90–93.
- (14) BILLIG, CH., (1994) *Pharmazie und Pharmaziestudium an der Universität Gießen*. Stuttgart.
- (15) WANKMÜLLER, A., (1981) *Studenten der Pharmazie und Chemie an der Universität Gießen von 1800–1852. Beiträge zur Württembergischen Apothekengeschichte* 13, 54–64, 95–96, 121–128 u. 148–160.
- (16) POSSEHL, I., (1994) *Modern aus Tradition. Geschichte der chemisch-pharmazeutischen Fabrik E. Merck Darmstadt*. Darmstadt, p. 44.
- (17) EBERHARD, A., (1938) *Liebig als Apothekenvisitator und die nachfolgende Neuorganisation des Besichtigungswesens im ehemaligen Großherzogtum Hessen*. In: *Die Vorträge der Hauptversammlung in München 29. bis 30. Oktober 1938*. Wien o. J.
- (18) WOLF, S., (1971) *Das deutsche pharmazeutische Reformschrifttum und Zeitschriftenwesen im 19. Jahrhundert*. Diss. Marburg, p. 245–248.
- (19) MÜLLER-JAHNCKE, W.-D., REINTHAL, A., (2003) *Die Pharmaceuten von heute sind nicht mehr die Pharmaceuten von früher“ – Das badische Apothekenwesen im 19. Jahrhundert bis zum Beginn der „Neuen Ära“ (1860)*. Dans: *Apotheke und Publikum. Die Vorträge der Pharmaziehistorischen Biennale in Karlsruhe vom 26. bis 28. April 2002*. Stuttgart (Veröffentlichungen zu Pharmaziegeschichte. Tome 3), p. 181–212.
- (20) THOMAS, U., (1985) *Die Pharmazie im Spannungsfeld der Neuorientierung: Philipp Lorenz Geiger (1785–1836). Leben, Werk und Wirken – Eine Biographie*. Stuttgart.
- (21) GÖTZ, W., (1980) *Zum 150. Jahrestag der Gründung der Sektion Pharmazie bei der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte in Hamburg 1830*. *Deutsche Apotheker Zeitung* 120, 1875–1878.

- (22) KRUSE, U., (2001) Die Pharmazie im Rahmen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte: 1822–1938. Stuttgart, p. 19–31.
- (23) GÖTZ, W., FRIEDRICH, CH., (1999) Der Briefwechsel von Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837). Acta Historica Leopoldina 18/4. Lieferung, Halle, p. 39.
- (24) ZIMMERMANN, H., (1985) Simon Rudolph Brandes (1795–1842), ein bedeutender Apotheker des 19. Jahrhunderts. Stuttgart.
- (25) GÖTZ, W., (1977) Zu Leben und Werk von Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837). Darstellung anhand bisher unveröffentlichten Archivmaterials. Würzburg.
- (26) FRIEDRICH, CH., (2001) Der Apotheker als Zeitschriftenredakteur in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Dans: Müller-Jahncke, W.-D. (Hrsg.), Der Apotheker und seine Fachliteratur. Stuttgart, p. 57–71.
- (27) Lettre de Liebig à Trommsdorff du 20.2.1837. Dans: Bettin, H., Friedrich, Ch., Götz, W. (Hrsg.): Der Briefwechsel von Johann Bartholomäus Trommsdorff (1770–1837). Halle 2001, p. 165 f. (Acta Historica Leopoldina 18/6).
- (28) HEUSER, E., (1989) Justus von Liebig und der Pharmazeut Friedrich Julius Otto in ihren Briefen von 1833–1840 und 1856–1867 (zugleich ein Beitrag zur Geschichte der Pharmazie in Braunschweig), Mannheim, p.20.

Clausura

JUAN MANUEL REOL TEJADA

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Hemos tenido una Sesión verdaderamente interesante en la que si tenemos que poner alguna pega es la de que el amplísimo perfil científico del Prof. Liebig nos ha llevado a consumir un cierto tiempo para ver sus diferentes facetas. Pero creo que se ha hecho una panorámica verdaderamente completa e interesante y todos los ponentes han buscado además que el tiempo fuera el mínimo posible. Yo les doy las gracias por ello.

La Profra. Francés nos dio una visión de lo que representó Liebig en los estudios de Farmacia en España y, en este campo de la historia, el Prof. Müller ha puesto en paralelo la influencia de Liebig en la farmacia alemana y hemos podido comprobar que ha sido absolutamente extraordinaria. Muchas gracias, además, Prof. Müller por esta Medalla conmemorativa que usted nos ha entregado a la Real Academia de Farmacia Nacional de España.

También hemos visto dos aspectos de Liebig en la agronomía desarrollados por el Prof. Gaspar González, y el Prof. Segundo Jiménez. En la química orgánica, la Profra. Avendaño y en la Nutrición el Prof. Bernabé Sanz, con lo cual hemos cerrado, como decía al principio, una panorámica de una figura tan compleja y extraordinaria como la del Prof. Liebig.

Quiero dar las gracias a todos los ponentes, muy especialmente al Prof. Müller, porque nos viene desde Heidelberg, hace un esfuerzo añadido y por consiguiente debemos hacerle una mención especial de gratitud. Y quiero dar las gracias a todos ustedes que se sientan en los estrados académicos porque son cerca de las 9 de las noche es un lunes y tenemos por delante una semana dura y sin embargo han venido para compartir estos momentos de reflexión en la Real Academia Nacional de Farmacia sobre el Prof. Liebig.

Nada más, reiterar de nuevo mi agradecimiento a todos ustedes.

Se levanta la sesión

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003, 69:

————— *Artículo original* —————

Optimización de la inmovilización de glucosa oxidasa en microgeles de poliacrilamida* .

JORGE RUBIO RETAMA, ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS¹,
BEATRIZ LÓPEZ-RUIZ

Departamento de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

RESUMEN

Se propone la síntesis de microgeles de poliacrilamida usando el método de polimerización en emulsión (W/O) concentrada, sin y con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* atrapada en su red polimérica. En las micropartículas sin enzima se estudió la influencia del agente iniciador en la temperatura máxima de polimerización y el grado de conversión del monómero en función del tiempo. Como resultado de la polimerización se obtuvieron en todos los casos micropartículas esféricas con un tamaño comprendido entre 2,5µm y 6,2µm de diámetro. En los microgeles con enzima se estudió la influencia del agente reticulante en diversos parámetros cinéticos. La utilización de las micropartículas con enzima como material biológico de un biosensor amperométrico permitió evaluar la actividad enzimática de la glucosa oxidasa atrapada en su red polimérica. La actividad catalítica del enzima atrapado se vio afectada por el grado de reticulación del microgel y como consecuencia la respuesta del biosensor sobre la que también influye la cantidad de micropartículas inmovilizadas en la superficie del electrodo que actúa como transductor del biosensor.

Palabras Clave: Síntesis de microgeles.— Emulsión concentrada glucosa oxidasa.— Inmovilización en microgeles de poliacrilamida.

* Premio Carlos del Castillo Leiva 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia

¹ *Departamento de Química-Física Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.*

SUMMARY

Optimization of glucose oxidase entrapment in polyacrylamide microgels

The synthesis of polyacrylamide microgels using the concentrated emulsion pathway (W/O), without and with entrapped glucose oxidase from *Aspergillus niger* is proposed. The effect of initiator concentration in the maximum temperature of polymerization and the conversion rate of the monomer as a function of time were studied in the microparticles without enzyme. As a result of the polymerization, spherical microparticulas were obtained in all the cases with a range of size between 2.5 μm and 6.2 μm of diameter. In the microgels with enzyme the effect of the cross-linking content in the kinetic parameters was studied. The use of the microgels with enzyme as the biological material of an amperometric biosensor allowed to evaluate the enzymatic activity of the glucose oxidase entrapped in the polymer. The catalytic activity of the entrapped enzyme and the biosensor response were affected by the cross-linking content of the microgel. The biosensor response was also affected by the quantity of microparticles immobilized in the surface of the electrode that acts as transducer of the biosensor.

Key words: Synthesis of microgels.— Concentrated emulsion.— Glucose oxidase.— Entrapment in polyacrylamide microgels.

INTRODUCCIÓN

En farmacia, medicina y biotecnología se han desarrollado un gran número de aplicaciones de las micropartículas de polímeros hidrofílicos. De todas ellas, la inmovilización de enzimas en estos sistemas ha sido intensamente investigada en los últimos años. La utilización de microgeles permite obtener sistemas con una gran relación superficie/volumen en la que poder unir o atrapar un enzima, que reaccionará posteriormente con un sustrato. Estos sistemas presentan una excelente estabilidad debido a que el enzima está protegido por la matriz polimérica, preservando su actividad durante largos períodos de tiempo. Son muchas las técnicas de inmovilización que se han descrito en los últimos años, de todas ellas destacamos el método de atrapamiento a partir de la polimerización desde emulsiones concentradas, que ha sido propuesto como un método idóneo para llevar a cabo la inmovilización de gran variedad de enzimas [1-6]. Este método consiste en preparar una emulsión (W/O) con una fase acuosa superior al 75% del volumen total de la emulsión [7-12]. En este tipo de emulsiones, las gotas dispersadas forman estructuras poliédricas separadas por una pequeña película de fase

oleosa. En el interior de estas estructuras poliédricas se produce la polimerización al añadir el agente iniciador, atrapando, durante este proceso, cualquier sustancia previamente disuelta en la fase acuosa junto con los monómeros.

En este trabajo se ha estudiado de qué manera afectan ciertos elementos de la síntesis como la cantidad de iniciador, la proporción de agente reticulante, la velocidad de conversión del monómero, etc., a las propiedades físicas de las micropartículas obtenidas. Así mismo se ha estudiado cómo la estructura de estas micropartículas afecta a la actividad catalítica del enzima atrapado.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos

El tamaño de las micropartículas de poliacrilamida fue evaluado mediante microscopia electrónica de barrido SEM. Las micrografías fueron realizadas en un microscopio electrónico JOEL JSM-6400. Las muestras de micropartículas analizadas en microscopia SEM, fueron liofilizadas y sombreadas con oro depositado por un Sputter Coater Blazer (SCD-004). Las medidas amperométricas del biosensor se realizaron mediante un potenciostato Metrohm Polarecord modelo E-506 en una celda de tres electrodos, electrodo de platino como electrodo de trabajo, electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y electrodo de platino como electrodo auxiliar. Los potenciales están referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Reactivos

El monómero acrilamida (AA) fue suministrado por Panreac, el agente iniciador, persulfato de amonio, el acelerador de la polimerización, NNN'N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), el Span 80 así como el dodecano por Fluka. El agente reticulante NN' metilen-bis-acrilamida (BAC) fue proporcionado por Aldrich, el enzima glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* (E.C: 1.1.3.4.) 6.000 U/g por Sigma, la membrana de diálisis de corte 12.000-14.000 por Spectrum Medical Industries y la β -D-

glucosa por Merck. Todos estos reactivos fueron utilizados tal y como fueron recibidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Síntesis de microgeles

Los microgeles sin enzima se sintetizaron a partir de una emulsión concentrada (W/O) siguiendo las indicaciones encontradas en la bibliografía (13-15). La emulsión concentrada se realizó mediante goteo con una jeringuilla, de la fase acuosa sobre la fase continua oleosa. En la Tabla I se da la composición detallada de los constituyentes de la emulsión concentrada. La emulsión fue homogenizada mediante agitación magnética. El oxígeno disuelto en la emulsión se eliminó mediante el paso de nitrógeno.

$$\text{En esta emulsión } \phi = \frac{V_{aq}}{V_{oleo} + V_{aq}} = 0.86.$$

TABLA I. Composición de la emulsión concentrada.

FASE OLEOSA	13,89%	
	Dodecano	750µl
	Span 80	250 µl
FASE ACUOSA	86,11 %	
	Agua bidestilada	5ml
	Acrilamida	1.25g
	NN´Metilen-bis-acrilamida	41 mg
	Persulfato de amonio	25 mg
	NNN´N´Tetrametil-ethylen-diamine	63 µl

Para comenzar la polimerización se añadió TEMED. Después de una hora de polimerización las micropartículas se precipitaron con metanol frío y se aislaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 10 °C. Posteriormente se lavaron las micropartículas con acetona. Para su conservación durante largos períodos de tiempo se liofilizaron y almacenaron a 4 °C. En la Figura 1 se pueden observar las micropartículas de poliacrilamida sin enzima obtenidas. Sus diámetros se encontraron comprendidos entre las 2,5 μm y 7 μm .

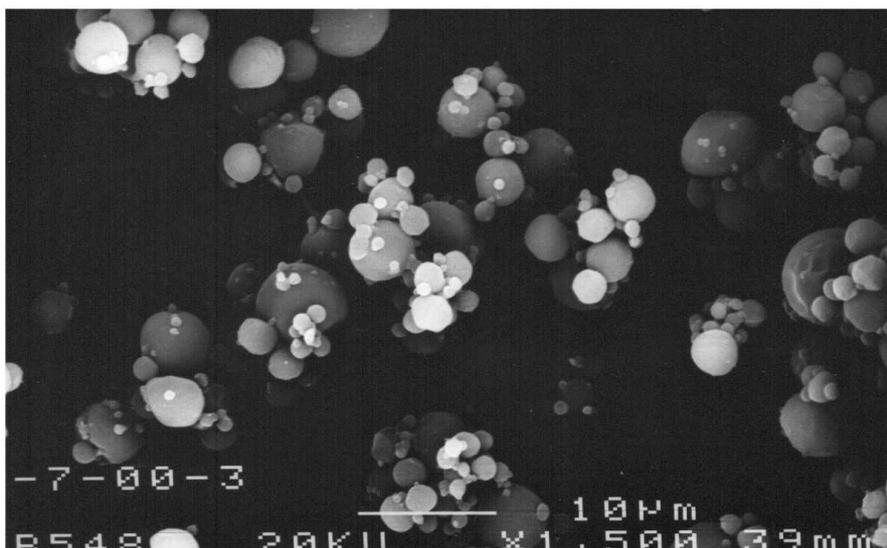


FIGURA 1.- Micrografía de micropartículas de poliacrilamida vacías

Control de la temperatura de polimerización

Un factor clave en la inmovilización de enzimas es la temperatura a la cual se realiza la polimerización. La reacción de polimerización es una reacción exotérmica cuya temperatura depende de la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. Por esta razón, se realizaron distintas síntesis variando la cantidad de iniciador desde 7 mM hasta 22 mM. La

Figura 2 muestra la temperatura de polimerización máxima ($T_{\text{máx}}$), alcanzada al añadir diferentes concentraciones de iniciador.

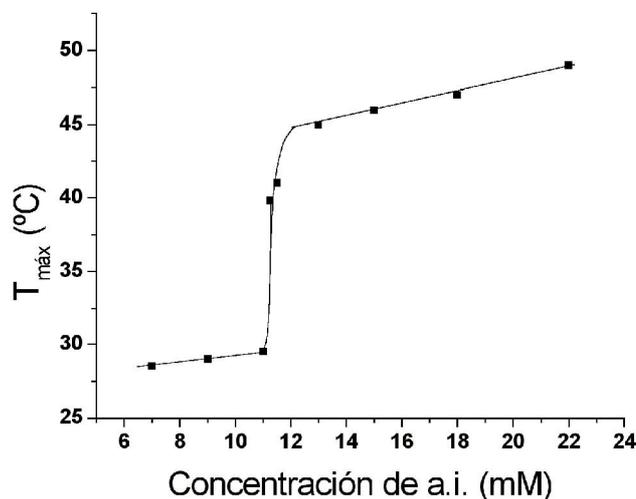


FIGURA 2.- Efecto de la cantidad de agente iniciador en la temperatura máxima de polimerización

La temperatura de polimerización aumenta al aumentar la concentración de iniciador, observándose un incremento brusco de la $T_{\text{máx}}$ entre 11,5 mM y 14 mM de persulfato de amonio. Como consecuencia de estos resultados para las síntesis posteriores se seleccionó una concentración de iniciador de 11 mM, ya que a esta concentración la temperatura de polimerización no supera los 30 °C, temperatura inferior a la de desnaturalización de la glucosa oxidasa.

Control del grado de polimerización

Con el objetivo de mantener el mínimo tiempo al enzima en el medio de reacción, se estudió la cinética de la reacción de polimerización. Para ello se llenaron 10 viales con 250 μl de emulsión concentrada. En cada vial se inició la polimerización a diferentes tiempos, parándose dicha reacción en todos los viales a la vez. El microgel resultante de la

polimerización se precipitó con metanol frío y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm, a continuación se secó en un horno a 100 °C durante 24 horas. Finalmente se pesó cada muestra anotando la cantidad de polímero obtenido con respecto al tiempo de reacción.

La Figura 3 muestra el grado de conversión del monómero cuando se utiliza una concentración de sulfato de amonio 11 mM. Como se puede observar en la gráfica el grado de conversión del monómero alcanza el 95 % una vez transcurridos 40 minutos de reacción. En las siguientes síntesis, pasado éste tiempo se dará por finalizada la reacción de polimerización.

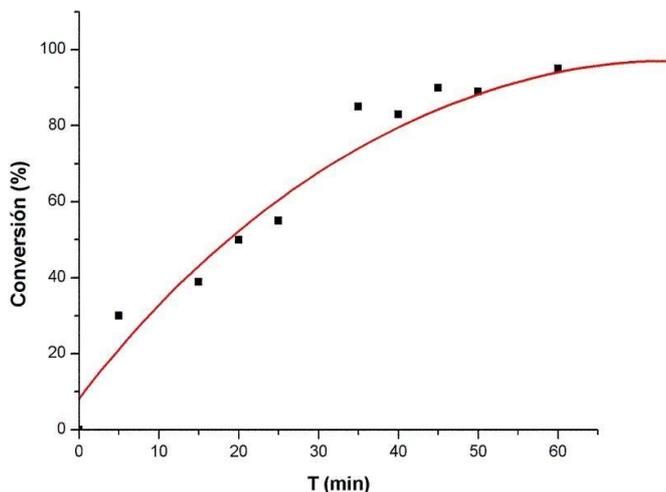


FIGURA 3. Grado de conversión del monómero en función del tiempo. Concentración de agente iniciador 11,5 mM

Síntesis de microgeles con glucosa oxidasa en su interior

En la síntesis de microgeles de poliacrilamida con GOx en su interior se utilizó el método anteriormente descrito, con ligeras modificaciones. Se preparó una fase acuosa constituida por tampón fosfato 0,1 M pH 7,2. en la cual se disolvieron los precursores del polímero y 25 0µg de GOx. Para iniciar la polimerización se añadió

persulfato de amonio 11mM. Se realizaron distintas síntesis en las que se modificó la proporción de agente reticulante/monómero [$\chi = \text{Ar(g)}/\text{M(g)} * 100$], $\chi = 0,7 \%$; $\chi = 1,6 \%$; $\chi = 3,2 \%$; $\chi = 5,2 \%$. Después de 40 minutos de síntesis se lavaron las micropartículas con tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 frío y acetona, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se liofilizaron. La Figura 4 muestra las micropartículas de poliacrilamida con GOx en su interior, con un diámetro comprendido entre las 3 μm y 7 μm .

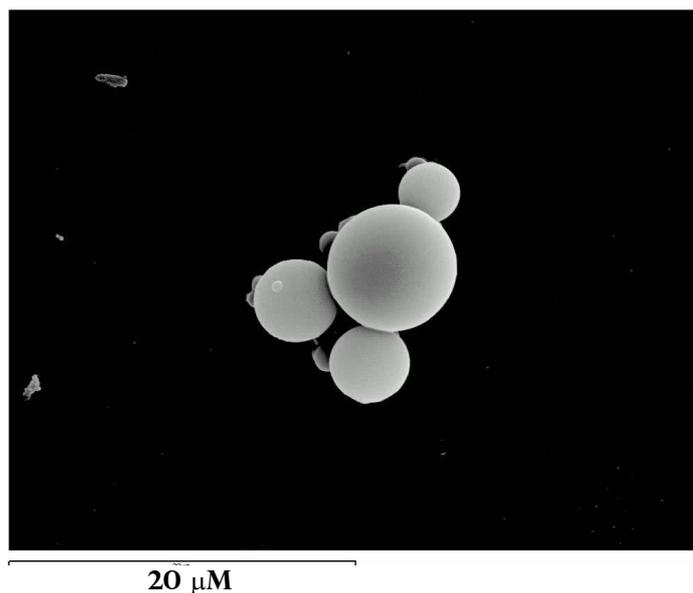


FIGURA 4. Micrografía de micropartículas de poliacrilamida con Gox en su interior

Influencia del grado de reticulación en la actividad catalítica del enzima inmovilizado

Para estudiar la actividad catalítica del enzima atrapado en el microgel se preparó un biosensor amperométrico de glucosa con un electrodo de platino como transductor y el microgel con enzima como componente biológico, en la Figura 5 se muestra un esquema del biosensor y del sistema de medida utilizado. Para su preparación se pesó 1 mg de micropartículas y se depositaron sobre la superficie del electrodo

de platino manteniéndose en contacto mediante una membrana de diálisis. Las medidas se realizaron a +0,6V vs SCE, este potencial permitió medir la oxidación del peróxido de hidrógeno formado en la reacción enzimática, las respuestas así obtenidas por el biosensor presentan una relación directa con la concentración de glucosa. Se utilizó una disolución tampón fosfato 0,1 M pH 7 como electrolito soporte sobre el que se realizaron adiciones sucesivas de glucosa 0,05 M hasta llegar a la concentración de glucosa correspondiente a la saturación enzimática. Tras cada adición se midió la respuesta del biosensor y se trazó la curva de calibrado correspondiente (Fig. 6) a partir de la cual se calcularon los parámetros enzimáticos, velocidad máxima (V_{max}) y constante aparente de Michaelis-Menten ($K_{m_{ap}}$).

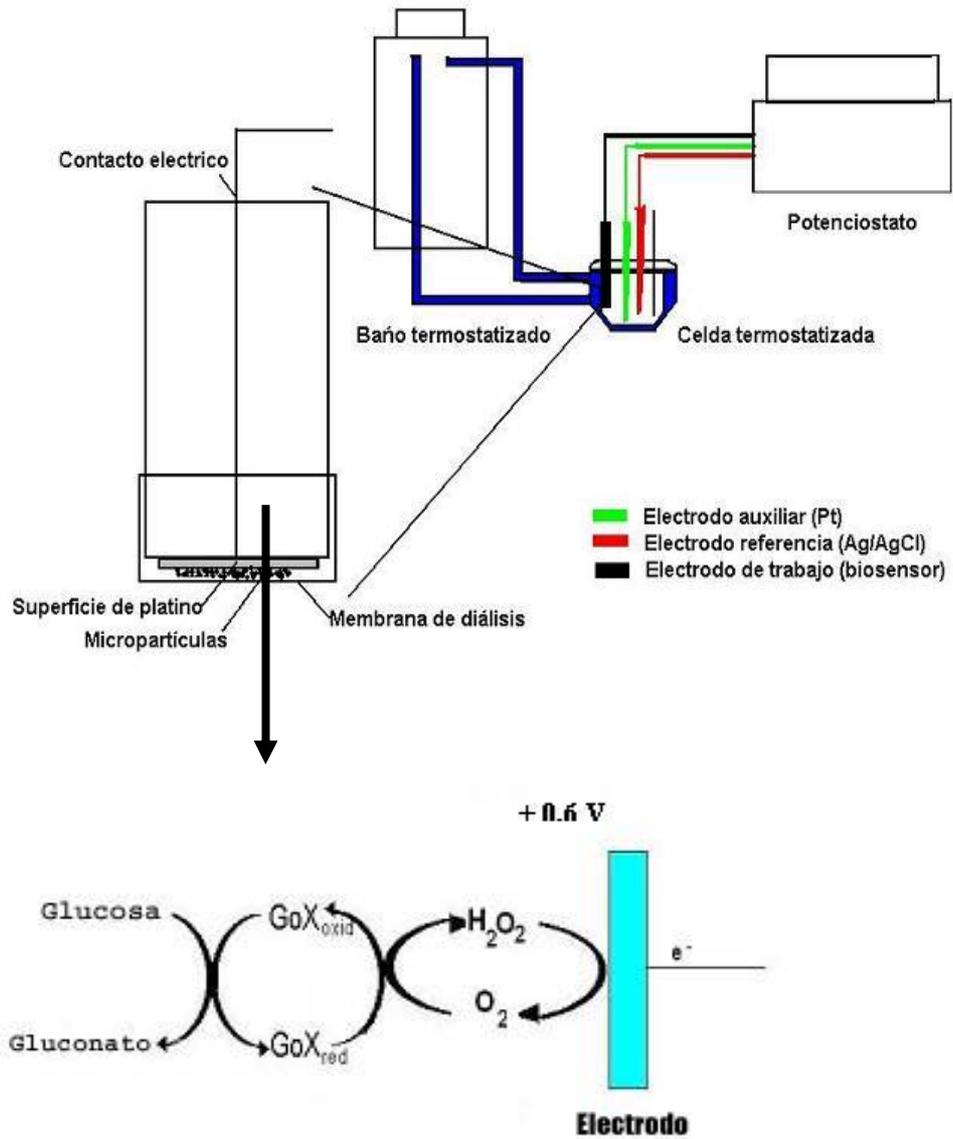


FIGURA 5. Esquema del sistema de medida que incluye un biosensor amperométrico

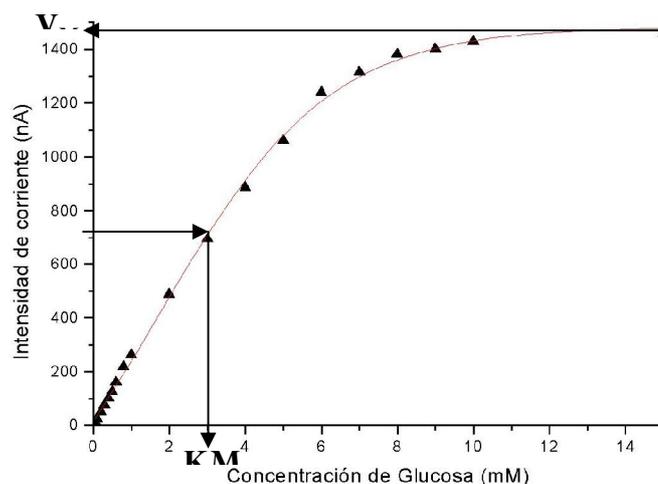


FIGURA 6. Curva de calibrado para la glucosa obtenida con el biosensor amperométrico

La Figura 7 muestra la evolución de V_{\max} y $K_{m_{ap}}$ al aumentar el grado de reticulación (χ) del microgel. V_{\max} alcanza su máximo valor a $\chi = 3,2\%$. Grados de entrecruzamiento inferiores generan menores respuestas como consecuencia de la menor cantidad de enzima disponible en el medio de inmovilización. Este efecto se atribuye a la formación de una red polimérica poco reticulada, con poros tan grandes que permiten la pérdida del enzima, especialmente durante los lavados. Cuando el grado de reticulación es mayor que $3,2\%$ el descenso de V_{\max} se puede atribuir a problemas difusionales del sustrato para alcanzar al enzima atrapado en la red polimérica, como consecuencia del alto grado de reticulación de la misma. Las micropartículas con $\chi = 3,2\%$ presentan el máximo valor de V_{\max} debido a que la red se encuentra lo suficientemente reticulada como para no perder el enzima, pero sin llegar a dificultar el paso de sustratos hacia el interior de las micropartículas. Sin embargo, $K_{m_{ap}}$ evoluciona de forma contraria, observándose un mínimo cuando $\chi = 3,2\%$. Estos resultados confirman que grados de reticulación bajos conllevan la pérdida de enzima y grados de reticulación elevados suponen, además de dificultades de difusión, impedimentos estéricos en los centros activos del enzima debidos al medio tan denso en el que se encuentran atrapadas.

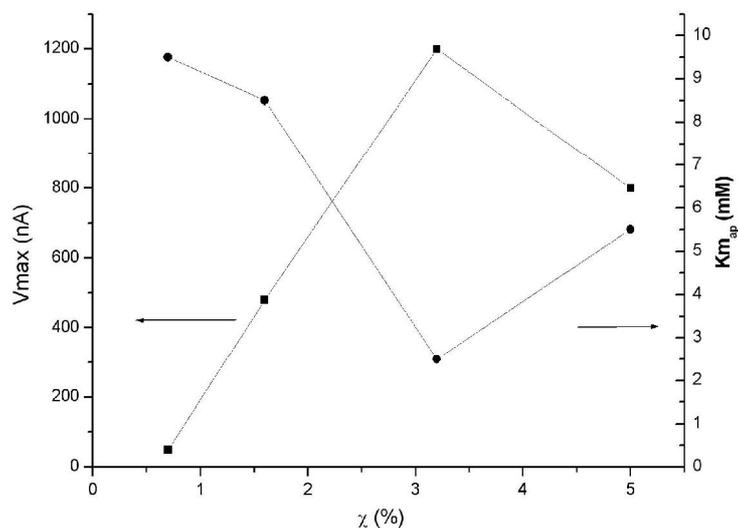


FIGURA 7. Influencia del grado de reticulación del microgel en la V_{max} y $K_{m_{ap}}$ del enzima atrapado

Influencia de la cantidad de micropartículas en la K_m aparente ($K_{m_{ap}}$) del enzima inmovilizado

Seleccionadas las micropartículas de $\chi = 3,2\%$ se depositaron cantidades crecientes de las mismas sobre la superficie del electrodo, desde 1mg hasta 6mg. La Figura 8 muestra la variación de los parámetros cinéticos V_{max} y $K_{m_{ap}}$ en función de la cantidad de micropartículas del biosensor amperométrico. En esta figura, se puede observar como ambos parámetros aumentan conforme lo hace la cantidad de micropartículas. Al aumentar la cantidad de micropartículas en el biosensor aumenta la cantidad de enzima disponible y por ello aumenta V_{max} , pero al aumentar el grosor y la compactación de la capa enzimática se dificulta la difusión de la glucosa hacia el interior de las micropartículas, lo que hace que la $K_{m_{ap}}$ aumente. Al utilizar una cantidad de micropartículas de 1 mg en la preparación del biosensor se obtiene una $K_{m_{ap}}$ muy similar a la del enzima en disolución (2,5 mM frente a 2 mM respectivamente).

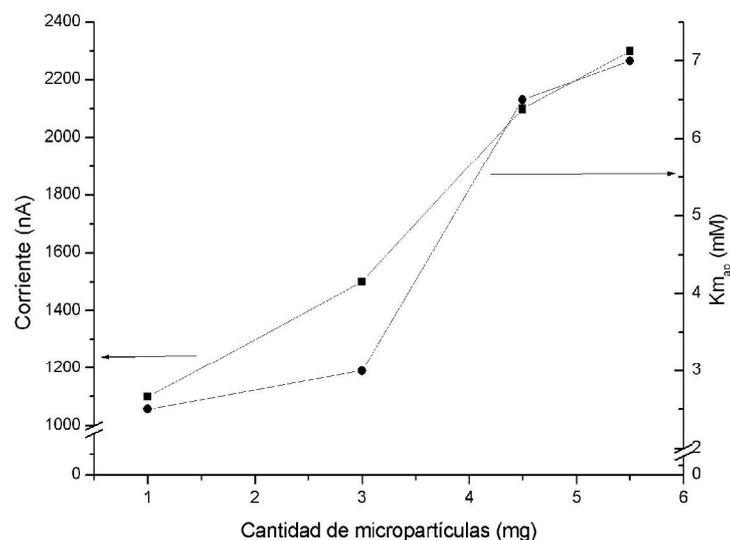


FIGURA 8. Influencia de la cantidad de micropartículas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo en la V_{max} y $K_{m_{ap}}$ del enzima atrapado.

CONCLUSIONES

En la síntesis de microgeles de poliacrilamida con persulfato de amonio de 11 mM la temperatura de la reacción no supera los 30 °C. Esta síntesis puede darse por concluida una vez transcurridos 40 minutos de reacción, tiempo en el que ha reaccionado el 95% del monómero. Las micropartículas así obtenidas presentan forma esférica con diámetros comprendidos entre las 2,5 μm y 7 μm , que apenas se ven afectados al incluir el enzima en la red polimérica.

Al utilizar estos microgeles como material biológico integrante de un biosensor amperométrico se observa que los de grado de reticulación $\chi = 3,2\%$ presentan el máximo valor de V_{max} y mínimo de $K_{m_{ap}}$ debido a que para este grado de reticulación se retiene el enzima, sin dificultar el paso del sustrato hacia el interior de la matriz polimérica. Cantidades altas de micropartículas depositadas sobre el electrodo dificultan la cinética enzimática.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de este trabajo a través del proyecto BMF-2000-0620, MAT2002-10233-E, MAT2003-03051-C03.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OH J, NAM Y, LEE K, PARK T (1999) *J Control Release* 57:269
- (2) PIZARRO C, FERNANDEZ TORROBA MA, BENITO C, GONZALEZ SAINZ JM (1997) *Biotechnol Bioeng* 53:497
- (3) GALLARDO A, FERNÁNDEZ F, CIFUENTES A, DIEZ-MASA JC, BERMEJO P, REBUELTA M, LOPEZ BRAVO A, SAN ROMAN J (2001) *J Control Release* 72:1
- (4) ORTEGA N, BUSTO MD, PEREZ MATEOS M (1998) *Bioresource Technol.* 64:105
- (5) EL-SAMALIGY M, ROHDEWALD P (1983) *Intern J Pharm* 13:23
- (6) SAHOO SK, TAPAS KD, GHOST PK, MAITRA A (1998) *J Colloid &Interface Sci* 206:361
- (7) BUM SL, OKANO T, KATAOKA K (1996) *J Pharm Sci* 85:85
- (8) PEKAREK KJ, JACOB JS, MATHLOWITZ E (1994) *Nature* 367:258
- (9) LANGER R, (1998) *Nature* 392:5
- (10) PONS R, RAVEY JC, SAUVAGE S, STÉBE SM, ERRA P, SOLANS C (1993) *Colloids & Surfaces A:Physicochem Eng Aspects* 76:171
- (11) PONS P, CARRERA I, ERRA P, KUNIEDA H, SOLANS C (1994) *Colloids & Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 91:259
- (12) RUCKENSTEIN E, PARK JS (1990) *Polymer* 31:2397.
- (13) KRIWET B, WALTER E, KISSEL T (1998) *J Controlled Release* 56:149.
- (14) BUM SL, OKANO T, KATAOKA K (1996) *J Pharm Sci* 85:85
- (15) TERREROS A (1999) Doctoral Thesis, University Complutense of Madrid (Chapter 6)

Anal. Real Acad. Nal. Farm. , 2003, 69:

————— *Artículo Original* —————

Caffeine and the biological role of adenosine receptors

BERTIL B. FREDHOLM

Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia en Suecia

RESUMEN

Cafeína y función biológica de los receptores de adenosina

Hace aproximadamente 30 años se descubrió que la cafeína, la más empleada de todas las sustancias psico-estimulantes, es capaz de antagonizar los efectos de la adenosina a concentraciones que se alcanzan durante el consumo normal de café y otros alimentos ó bebidas. Este descubrimiento tiene varias consecuencias importantes: 1) existen receptores para los cuales la adenosina es el agonista y la cafeína el antagonista; 2) Ya que el antagonista es biológicamente activo, los receptores deben de estar activados por la adenosina endógena. Esta breve visión de conjunto, la cual refleja el contenido del Discurso de Entrada en la Real Academia de Farmacia del Profesor B. Fredholm, presentará los datos que avalan las conclusiones previamente enunciadas.

El metabolismo de la adenosina y sus niveles en condiciones normales y fisiopatológicas es conocido con detalle. Actualmente han sido clonados y caracterizado farmacológicamente cuatro receptores de adenosina. Todos ellos están acoplados a proteínas G y tienen cascadas de señalización y distribuciones diversas en el organismo. Es probable que los efectos biológicos de la cafeína se realicen mayoritariamente a través de receptores A₁ y A_{2A}. Los datos obtenidos con ratones genéticamente modificados, anulando estos genes confirma su función biológica.

Palabras clave: Cafeína.— Enfermedad de Parkinson.— Factores CREB.— Nucleo estriado— Neuronas GABAérgicas.— Proteínas G.— Receptores de adenosina.— Receptores de dopamina.

SUMMARY**Caffeine and the biological role of adenosine receptors**

About thirty years ago it was realized that caffeine, the most widely used of all psychoactive drugs, is able to antagonize the effects of adenosine at concentrations achieved during normal human consumption. This finding had several important implications: 1) there are receptors at which adenosine is the agonist and caffeine the antagonist; 2) since the antagonist is biologically active it should mean that the receptors are activated by endogenous adenosine. This brief overview, which reflects the contents of my introductory lecture at the Academy, will present some data vindicating these conclusions.

The metabolism of adenosine and its levels under normal and pathophysiological conditions has been elucidated. Now four different adenosine receptors have been cloned and pharmacologically characterized. They are all G protein coupled. Their different signalling characteristics are briefly summarized as is their distribution. Based on these data it is concluded that caffeine probably exerts its effects by blocking adenosine A₁ and A_{2A} receptors. The biological role(s) of these receptors is finally presented using data from knock-out mice.

Key words: Caffeine.— Parkinson's disease.— CREB factors.— Striatum.— GABAergic neurons.— G proteins.— Adenosine receptors.— Dopamine receptors.

About thirty years ago it was realized, from the work of i.a. Ted Rall and John Daly, that caffeine, the most widely used of all psychoactive drugs, is able to antagonize the effects of adenosine at concentrations achieved during normal human consumption (see Fredholm; 1980). This finding had several important implications: 1) there are receptors at which adenosine is the agonist and caffeine the antagonist; 2) since the antagonist is biologically active it should mean that the receptors are activated by endogenous adenosine. This brief overview, which reflects the contents of my introductory lecture at the Academy, will present some of the data from my own laboratory vindicating these conclusions. The interested reader is referred to other more compendious reviews (Ferré, Fredholm, Morelli, Popoli and Fuxe; 1997, Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig and Zvartau; 1999, Svenningsson, Le Moine, Fisone and Fredholm; 1999, Fredholm, IJzerman, Jacobson, Klotz and Linden; 2001, Fredholm; 2002, Svenningsson and Fredholm; 2002, Fredholm and Svenningsson; 2002 Submitted, Fredholm, Cunha and Svenningsson; 2003). I also need to

point out that the extremely important contributions by other scientists will not be covered here.

Regulation of the levels of adenosine

It should be clearly understood that adenosine does not act as a classical hormone or neurotransmitter: it is not stored in vesicles, it is not released by exocytosis, it does not appear to transfer information from the pre- to the postsynaptic components and it does not act only or predominantly in synapses. Instead, adenosine fulfils a double role (see Cunha; 2001a), acting both as a homeostatic trans-cellular messenger, and as a modulator, controlling i.a. neurotransmitter release and neuronal excitability.

Adenosine can appear in the extracellular milieu through three different mechanisms: 1) the release of adenosine as such through nucleoside transporters upon increase of the intracellular levels of adenosine; 2) the extracellular formation of adenosine through the ecto-nucleotidase pathway on release of adenine nucleotides, and 3) the extracellular formation of adenosine on release of cAMP (reviewed in Dunwiddie and Masino; 2001). The third pathway has been found to be of minor importance in more integrated preparations when physiological parameters affected by adenosine are being studied (Brundege, Diao, Proctor and Dunwiddie; 1997).

The idea that adenosine is mostly released as such through the different classes of nucleoside transporters is probably the most popular hypothesis. It was formulated essentially by analogy with the way extracellular adenosine is generated upon cytotoxic insults, like hypoxia or metabolic poisoning (for references, see Cunha; 2001a, Dunwiddie and Masino; 2001, Latini and Pedata; 2001). In stressful situations, there is an imbalance between energy supply and demand, leading to a net hydrolysis of ATP. Via a series of steps, this ATP is converted to adenosine, leading to a dramatic increase in the intracellular concentration of adenosine, which, at rest, is around 50 nM. The presence of non-concentrative bi-directional adenosine transporters will then force extracellular adenosine to rise in parallel with intracellular adenosine. Given that intracellular

ATP levels are some 100,000 times higher, it is obvious that substantial changes in adenosine levels can occur without any major changes in ATP levels. Indeed, extracellular adenosine can be formed without any measurable change in the energy status of CNS preparations (Mitchell, Lupica and Dunwiddie; 1993, Doolette; 1997). Given that the energy demanded – and hence the utilization of ATP – is substantial in localized neuronal compartments as a consequence of work needed to maintain ion balance, it is clear that substantial local adenosine formation could occur via this mechanism. Nevertheless, it is difficult to explain the time course of extracellular adenosine build-up, which may become sufficient to modulate synaptic transmission in less than 20 ms (Mitchell et al.; 1993), a time course much lower than the K_{cat} of most enzymes and adenosine transporters. Also, this release of adenosine through nucleoside transporters is at odds with the ability of inhibitors of nucleoside transport to potentiate the effects of endogenous adenosine (for references, see Cunha; 2001a, Latini and Pedata; 2001), which indicates that the role of nucleoside transporters is mostly to clear up rather than to mediate adenosine release, at least in non-stressful situations. Nevertheless, and as discussed previously, this finding may be explained if in any compartment there are cells that produce adenosine, and others that release it (Fredholm, Lindström and Wallman-Johansson; 1994).

The last hypothesis concerning the origin of extracellular adenosine is based on the extracellular catabolism of released adenine nucleotides, mainly of released ATP, through the ecto-nucleotidase pathway (for reviews, see Zimmermann; 2000, Cunha; 2001b). In fact, in contrast to adenosine, ATP is present in synaptic vesicles and the vesicular release of ATP on stimulation of nerve terminals is well documented (see references in Cunha; 2001a). However, only a few studies have so far gathered direct evidence for the role of ecto-nucleotidases in forming extracellular adenosine (see references in Cunha; 2001a-b). This might be due to the difficulty to block completely an enzyme system that is extremely efficient and where the spatial relationship between enzyme and effector system is very close (Dunwiddie, Diao and Proctor; 1997, Cunha, Sebastião and Ribeiro; 1998, Cunha; 2001b). It should also be pointed out that neurochemical studies have concluded that the extracellular adenosine, which is relevant

for modulation of synaptic transmission, might originate not only from nerve terminals but also from the activated postsynaptic component (see references in Cunha; 2001a, Dunwiddie and Masino; 2001, Latini and Pedata; 2001) as well as from surrounding non-neuronal cells. Both astrocytes and dendritic compartments are apparently devoid of a fast exocytotic apparatus and yet they are also able to release ATP (Caciagli, Ciccarelli, Di Iorio, Ballerini and Tacconelli; 1988) by a mechanism largely unknown (Bodas, Aleu, Pujol, Martin-Satué, Marsal and Solsona; 2000, Bodin and Burnstock; 2001).

Thus, there are several mechanisms that contribute to the formation of extracellular adenosine. And most importantly, it should be stressed that to understand how adenosine is released, one needs to keep in mind that different stimuli will trigger different ways of generating extracellular adenosine. Figure 1 schematically represents the possible contributions of the different compartments in the CNS to control the extracellular levels of purines.

Some mechanisms of adenosine formation and metabolism

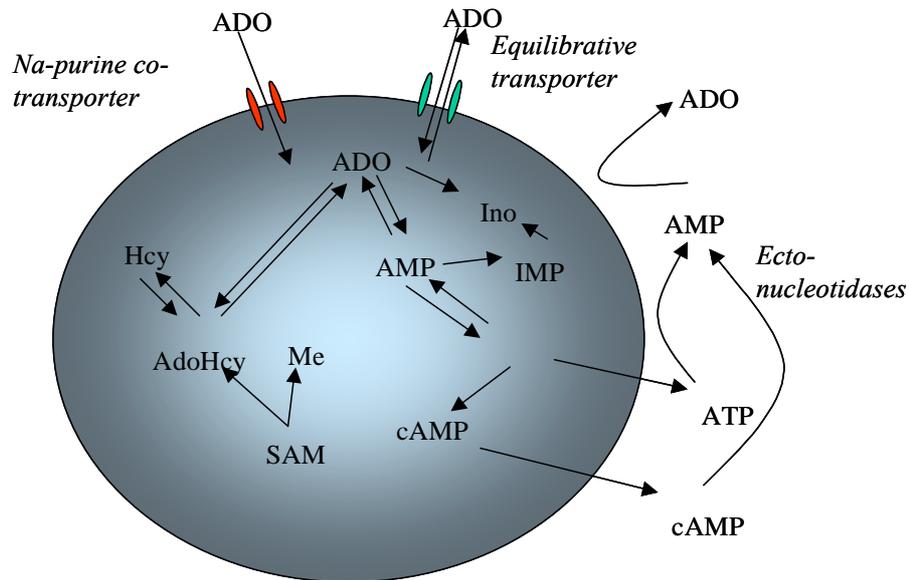


FIGURE 1. Schematic representation of the mechanisms by which adenosine levels are regulated.

In contrast, the clearance of extracellular adenosine is better understood. It mostly occurs through the action of the non-concentrative adenosine transporters, and the effectiveness of the uptake system is guaranteed by the efficient intracellular metabolism of adenosine. Indeed, adenosine can either be converted into inosine through adenosine deaminase or be phosphorylated into AMP via adenosine kinase. The comparison of the kinetic parameters of each of the enzymes lead to the proposal that adenosine kinase was the initial pathway to salvage intracellular adenosine, with adenosine deaminase only coming to play when large amounts of adenosine have to be cleared. This is confirmed by the general greater effectiveness of adenosine kinase inhibitors to increase the extracellular levels of adenosine under physiological situations and the increased effectiveness of adenosine deaminase inhibitors to increase the extracellular levels of adenosine with increased neurotoxic insults.

This probably reflects the relative importance of neuronal versus non-neuronal uptake of adenosine since the two enzymatic activities have apparently different cellular locations with adenosine kinase being enriched in neurons and adenosine deaminase being more abundant in astrocytes. It should also be mentioned that adenosine can also be extracellularly deaminated into its inactive metabolite inosine through an ecto-adenosine deaminase (Franco, Casadó, Ciruela, Saura, Mallol, Canela and Lluís; 1997), although the relevance of this pathway for adenosine clearance in the CNS remains to be established (Cunha; 2001b).

An alternative pathway for intracellular metabolization of adenosine would be via the S-adenosylhomocysteine pathway. But although this pathway is of relevance for the control of intra- and extracellular levels of adenosine in cardiomyocytes for instance, it appears to be of limited importance in the nervous system.

The balance between the effectiveness of releasing and clearing up adenosine will give rise to a transient extracellular build up of adenosine. However, the presumably different location of release sites and uptake sites makes it difficult to estimate an extracellular concentration of adenosine since one should instead discuss the amplitude of extracellular adenosine gradient. Pharmacological manipulation of the activity of adenosine transporters and adenosine receptor responses have led to an estimate of the transient concentration of adenosine facing A₁ receptors between 200-400 nM in the rat brain (Dunwiddie and Diao; 1994). This estimate of an effective concentration of adenosine is similar to those found in microdialysis studies without stimulating or insulting the CNS (Hagberg, Andersson, Lacarewicz, Jacobson, Butcher and Sandberg; 1987). Upon stimulation (During and Spencer; 1992) or upon stressful conditions (Hagberg et al.; 1987) the extracellular amounts of adenosine can build up to tenths of micromolar.

Adenosine receptors

Despite the fact that adenosine receptors were well characterized and partially purified the two first adenosine receptors cloned, A₁ and A_{2A}, came from a library of orphan receptors from the dog thyroid (Maenhaut, Van Sande, Libert, Abramowicz, Parmentier, Vanderhaegen,

Dumont, Vassart and Schiffmann; 1990, Libert, Schiffmann, Lefort, Parmentier, Gerard, Dumont, Vanderhaeghen and Vassart; 1991). Soon the same receptors were cloned from rat and humans (Mahan, McVittie, Smyk-Randall, Nakata, Monsma Jr, Gerfen and Sibley; 1991, Furlong, Pierce, Selbie and Shine; 1992), and a related receptor, the A_{2B} receptor, was cloned from rat brain (Stehle, Rivkees, Lee, Weaver, Deeds and Reppert; 1992). These receptors had all been predicted from extensive pharmacological studies. The fourth receptor, A₃, was more unexpected. By now these four adenosine receptors have been cloned from several mammalian and non-mammalian species. A₁, A_{2A} and A_{2B} receptors are well conserved among mammals, but A₃ receptors show considerable structural variability.

For all four adenosine receptors the coding region is split up by an intron in a region corresponding to the second intracellular loop (Fredholm, Arslan, Halldner, Kull, Schulte and Wasserman; 2000). Already when the structure of the A₁ receptor was first reported the presence of two major transcripts was noted. Transcripts containing three exons, called exons 4, 5 and 6 were found in all tissues expressing the receptor, whereas transcripts containing exons 3, 5 and 6 are in addition found in tissues such as brain, testis and kidney, that express high levels of the receptor (Ren and Stiles; 1994, 1995). There are two promoters, a proximal one denoted promoter A, and a distal one denoted promoter B, which are about 600 bp apart. The 5'-untranslated region of the adenosine A_{2A} receptor gene also displays two alternative promoters, although it lacks the diversity of exons found in the A₁ receptor gene (Chu, Tu, Lee, Kuo, Lai and Chern; 1996, Lee, Chang, Su, Lin, Sun, Lai and Chern; 1999). The A_{2A} receptor shows one hybridizing transcript in most tissues examined (Stehle et al.; 1992, Ren and Stiles; 1994, 1995). The rat A_{2B} receptor shows two hybridizing transcripts of 1.8 and 2.2 kb, where the latter is the dominant one (Stehle et al.; 1992). This could, in analogy with the above, suggest the presence of multiple promoters. The human A₃ receptor shows two transcripts: the most abundant is approximately 2 kb in size, and the less abundant one about 5 kb (Atkinson, Townsend-Nicholson, Nicholl, Sutherland and Schofield; 1997), perhaps indicating similarities with the A₁ receptor gene.

The distribution of receptors tells us where agonists and antagonists given to the intact organism can act. Furthermore, the rather low levels of endogenous adenosine present under basal physiological conditions have the potential of activating receptors where they are abundant, but not where they are sparse (Svenningsson, Nomikos and Fredholm; 1999).

There is much information on the distribution of the A₁ and A_{2A} receptors from several different species, because good pharmacological tools including radioligands (see below) are available. There are also several studies that have used antibodies to localize adenosine A₁ and A_{2A} receptors in brain (Rosin, Robeva, Woodard, Guyenet and Linden; 1998, Hettinger, Lee, Linden and Rosin; 2001). In the case of the A_{2B} and A₃ receptors the data are less impressive. Here one tends to rely on data on the expression of the corresponding mRNA. Some of this information is summarized in Table 1.

Adenosine A₁ receptor mRNA is widespread in the brain, with the highest levels in cell bodies in hippocampus, cerebellum and cerebral cortex (Mahan et al.; 1991, Reppert, Weaver, Stehle and Rivkees; 1991). Studies using immunohistochemistry and ligand autoradiography have shown that adenosine A₁ receptor protein and the corresponding mRNA do not exactly match in several regions of the central nervous system (Johansson, Ahlberg, van der Ploeg, Brené, Lindfors, Persson and Fredholm; 1993, Swanson et al.; 1995). Much of the differential distribution can probably be explained by the fact that a substantial number of adenosine A₁ receptors are present at nerve terminals. For example, a careful examination of the comparative distribution of adenosine A₁ receptor mRNA and protein in hippocampus showed that this mRNA is enriched in cell bodies in the granular layer of dentate gyrus and the pyramidal layers of CA1 and CA3, whereas [³H]DPCPX binding and A₁ receptor immunoreactivity is predominantly found in the dentate hilus stratum moleculare, stratum lacunosum, stratum radiatum and stratum oriens (Swanson et al.; 1995). Double immunofluorescence experiments showed that A₁ receptor protein co-localize with SMI-31 that labels axons, but to a lesser extent with MAP2a, b, which labels cell bodies and dendrites, or with synaptophysin, which labels synapses.

Interestingly, the levels of adenosine A₁ receptor mRNA and protein are differently regulated by, e.g., long term antagonist treatment (Johansson, Ahlberg, van der Ploeg, Brené, Lindefors, Persson and Fredholm; 1993) and during development (Ådén, Herlenius, Tang and Fredholm; 2000). The general distribution of adenosine A₁ receptors is similar between rodents and humans (Fastbom, Pazos and Palacios; 1987, Svenningsson, Hall, Sedvall and Fredholm; 1997, Schindler, Harris, Hayes, Papotti and Humphrey; 2001). Initial attempts to localize adenosine A₁ receptors in the living brain using [¹¹C]KF15372 and [¹¹C]MPDX and positron emission tomography (PET) have been made (Noguchi, Ishiwata, Furuta, Simada, Kiyosawa, Ishii, Endo, Suzuki and Senda; 1997, Shimada, Ishiwata, Kiyosawa, Nariai, Oda, Toyama, Suzuki, Ono and Senda; 2002).

Adenosine A_{2A} receptor mRNA is highly enriched in the striatum (Schiffmann, Libert, Vassart and Vanderhaeghen; 1991, Fink, Weaver, Rivkees, Peterfreund, Pollack, Adler and Reppert; 1992, Svenningsson, Hall, Sedvall and Fredholm; 1997). Lower levels are also found in extrastriatal areas, such as lateral septum, cerebellum, cortex and hippocampus (Dixon, Gubitz, Sirinathsinghji, Richardson and Freeman; 1996, Svenningsson, Hall, Sedvall and Fredholm; 1997). Most striatal neurons (95%) are GABAergic projection neurons. These neurons can be divided into two major subtypes based on their target areas and neuropeptide contents. One sub-population projects to globus pallidus and contain enkephalin. Another sub-population projects to substantia nigra pars reticulata/the entopeduncular nucleus and contains substance P and dynorphin. Interestingly, adenosine A_{2A} receptors are selectively expressed in the enkephalin-containing striatopallidal neurons (Schiffmann, Libert, Vassart and Vanderhaeghen; 1991, Fink et al.; 1992, Augood and Emson; 1994, Svenningsson, Hall, Sedvall and Fredholm; 1997). In addition to the GABAergic projection neurons, there are also cholinergic and GABAergic interneurons in striatum. It is still controversial whether these interneurons contain adenosine A_{2A} receptors. Studies using in situ hybridization have been unable to detect adenosine A_{2A} receptor mRNA in interneurons (Schiffmann, Libert, Vassart and Vanderhaeghen; 1991, Augood and Emson; 1994, Svenningsson, Hall, Sedvall and Fredholm; 1997). However, a single cell PCR study detected

adenosine A_{2A} receptor mRNA in cholinergic interneurons (Richardson, Dixon, Lee, Bell, Cox, Williams, Pinnock and Freeman; 2000).

Studies using immunohistochemistry and ligand autoradiography show high levels of adenosine A_{2A} receptors in all sub-regions of striatum (Jarvis and Williams; 1988, Parkinson and Fredholm; 1990, Rosin et al.; 1998). In addition, high levels of adenosine A_{2A} receptors have also been found in globus pallidus. These receptors are located on nerve terminals from the striatal projection neurons which innervate globus pallidus (Rosin et al.; 1998). Using A_{2A} receptor-selective antibodies and immunohistochemistry at the light- and electron-microscopic levels, Rosin and her colleagues (Rosin et al.; 1998, Hettinger et al.; 2001) have shown that striatal adenosine A_{2A} receptors are found in most neuronal compartments, i.e. dendrites, terminals of axon collaterals and in soma. However, the highest levels are found in dendrites and dendritic spines that form asymmetric synapses. These synapses receive input from glutamatergic terminals and are of excitatory nature. This postsynaptic localization of A_{2A} receptors implies that A_{2A} receptors may play an important role in the regulation of synaptic plasticity. Indeed, a functional correlate to this anatomical finding has recently been demonstrated, namely that NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the nucleus accumbens is significantly attenuated by selective A_{2A} receptor antagonists or in A_{2A} receptor KO mice (d'Alcantara, Ledent, Swillens and Schiffmann; 2001).

The distribution of adenosine A_{2A} receptors is similar in rodents and humans (Martinez-Mir, Probst and Palacios; 1991, Schiffmann, Libert, Vassart and Vanderhaeghen; 1991). However, the levels of extrastriatal adenosine A_{2A} receptors appear to be higher in humans than in rodents. Since there is accumulating evidence for a critical role of adenosine A_{2A} receptors in the pathophysiology of several neurological and psychiatric disorders, most notably Parkinson's disease and schizophrenia, it will be of great interest to be able to monitor the levels of adenosine A_{2A} receptors in the living brain using PET. There are several reports about various ligands, including [¹¹C]KW-6002, [¹¹C]IS-DMPX, [¹¹C]KF 18446 and [¹¹C]KF 17837 (Stone-Elander, Thorell, Eriksson, Fredholm and Ingvar; 1997, Ishiwata, Noguchi, Wakabayashi,

Shimada, Ogi, Nariai, Tanaka, Endo, Suzuki and Senda; 2000, Hirani, Gillies, Karasawa, Shimada, Kase, Opacka-Juffry, Osman, Luthra, Hume and Brooks; 2001). However, these PET ligands do not appear ideal since non-specific, extrastriatal binding is high.

Biochemical studies have demonstrated low levels of adenosine A_{2B} receptors on most neurons and glia cells and in situ hybridization studies specifically demonstrated the presence of adenosine A_{2B} receptor mRNA in the hypophyseal pars tuberalis (Stehle et al.; 1992). The levels of A_3 receptors in the brain are also low, but there appear to be species differences, with the levels being higher sheep and humans than in rodents (Salvatore, Jacobson, Taylor, Linden and Johnson; 1993).

Signaling via Adenosine Receptors

The adenosine A_1 and A_2 receptors were initially subdivided on the basis of their ability to inhibit and stimulate adenylyl cyclase, respectively (Londos, Cooper and Wolff; 1980). Indeed, A_1 and A_2 receptors are coupled to members of the G_i group and G_s group of G proteins, respectively (Table 1).

	Adenosine A₁ receptor	Adenosine A_{2A} receptor	Adenosine A_{2B} receptor	Adenosine A₃ receptor
Previous/Alternative names	R ₁ ; AA1R	A _{2a} , R _s ; AA2AR	A _{2b} , R _s ; AA2BR	AA3A
Selective agonists	CPA, CCPA, CHA	CGS 21680, HE-NECA, CV-1808, CV-1674, ATL146e	None	CI-IB-MECA
Selective antagonists	DPCPX ^a 8-cyclopentyl-theophylline, WRC0571	selective: SCH 58261 ^{f,g} moderately selective: ZM241385 ^a , KF 17387, CSC	MRS1754 ⁱ , enprofylline	MRS 1220, MRE 3008-F20, MRS 1191; MRS 1523
Radioligands	[³ H]-DPCPX; [³ H]-CHA	[³ H]-CGS 21680; [³ H]-SCH 58261; [³ H]-ZM-241385	([³ H]-ZM-241385; [³ H]-DPCPX) [³ H]-MRS1754	[³ H]- MRE 3008-F20
Antibodies	Several commercial and non-commercial peptide antibodies	Several commercial and non-commercial peptide antibodies;	Some commercial and non-commercial peptide antibodies	Some commercial and non-commercial peptide antibodies
Structural information (Accession numbers)	Human 326 aa, P30542, , rat 326 aa, P25099,	Human 410 aa, P29274, rat 409 aa, P30543, mouse 409 aa, UO5672	Human 328 aa, P29275, rat 332 aa, P29276 mouse 332 aa, UO5673	Human 318 aa, P33765, rat 320 aa P28647(Alternative splicing in rat can yield product with 337 aa) Mouse 320 aa, AF069778
G protein coupling	G _i , G _o	G _s , G _{olf}	G _s , G _q	G _i
Expression pattern in nervous system.	High expression: Brain (cortex, cerebellum, hippocampus). Dorsal horn of spinal cord. Eye, adrenal gland Intermediate levels: Other brain regions.	High expression: Striatopallidal GABAergic neurons (in caudate-putamen, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium), olfactory bulb Low levels: Rest of brain	Intermediate levels: Blood vessels, eye, median eminence, mast cells (human?) Low levels: Adrenal gland, pituitary gland	Intermediate levels: <i>Cerebellum (human?), hippocampus (human?)</i> Low levels: Most of brain (rat, mouse).
Gene name/chromosomal location	chr 1q32.1	chr 22g11.2	chr 17p11.2-12;	chr 1p21-13,
Main physiological function(s)	Bradycardia; inhibition of lipolysis; reduced glomerular filtration; tubero-glomerular feedback, antinociception;	Regulation of sensorimotor integration in basal ganglia; inhibition of platelet aggregation and	Relaxation of smooth muscle in vasculature and intestine; inhibition of monocyte and macrophage function,	Enhancement of mediator release from mast cells (some species). Preconditioning (some species).

	reduction of sympathetic and parasympathetic activity; presynaptic inhibition; neuronal hyperpolarization; ischemic preconditioning.	polymorphonuclear leukocytes; vasodilatation, protection against ischemic damage, stimulation of sensory nerve activity.	stimulation of mast cell mediator release (some species).	
Knockout phenotype	Anxiety, hyperalgesia, decreased tolerance to hypoxia, loss of tubero-glomerular feedback	Anxiety, hypoalgesia, hypertension, increased tolerance to ischemia, altered sensitivity to motor stimulant drugs, decreased platelet aggregation.		Altered inflammatory reactions, decreased edema, altered release of inflammatory mediators.

The A_3 receptor is also G_i coupled. In addition, there is some evidence from transfection experiments that the adenosine receptors may signal via other G proteins, but it is not known if such coupling is physiologically important. Recently, evidence was presented that whereas the A_{2A} receptor is coupled to G_s in most peripheral tissues it is coupled to G_{olf} in striatum (Kull, Svenningsson and Fredholm; 2000). Endogenous A_{2B} receptors of HEK 293 cells, human HMC-1 mast cells and canine BR mast cells may be dually coupled to G_s and G_q

After activation of the G proteins, enzymes and ion channels are affected as can be predicted from what is known about G protein signaling. Thus, A_1 receptors mediate inhibition of adenylyl cyclase, activation of several types of K^+ -channels (probably via β,γ -subunits), inactivation of N, P and Q-type Ca^{2+} channels, activation of phospholipase $C\beta$ etc. The same appears to be true for A_3 receptors. In CHO cells transfected with the human adenosine A_3 receptor both adenylyl cyclase inhibition and a Ca^{2+} signal are mediated via a $G_{i/o}$ -dependent pathway. Given that many of the steps in the signaling cascade involve signal amplification it is not surprising that the position of the dose-response curve for agonists will depend on which particular effect is measured. Both A_{2A} and A_{2B} receptors stimulate the formation of cAMP, but other actions, including mobilization of intracellular calcium (e.g. Mirabet, Mallol, Lluís and Franco; 1997), have also been described. Actions of adenosine A_{2A} receptors on neutrophil leukocytes are due in part to cAMP, but cyclic AMP-independent effects of A_{2A} receptor activation in these cells have also been suggested.

Activation of A_1 receptors can dose and time dependently activate ERK1/2 via β,γ -subunits released from pertussis toxin-sensitive $G_{i/o}$ proteins and phosphoinositol-3-kinase.

Activation of A_{2A} receptors also increases MAPK activity (Sextl, Mancusi, Holler, Gloria-Maercker, Schutz and Freissmuth; 1997) but the signaling pathways used by the A_{2A} receptor seem to vary with the cellular background and the signaling machinery that the cell possesses (Seidel, Klingler, Freissmuth and Holler; 1999). A_{2A} receptor activation may not only stimulate, but also inhibit ERK phosphorylation (Hirano, Aoki, Ogasawara, Kodama, Waga, Sakanaka, Shimizu and Nakamura;

1996, Arslan and Fredholm; 2000), probably via PKA-dependent phosphorylation of Raf-1. The adenosine A_{2B} receptor is the only subtype that has so far been shown to activate not only ERK1/2, but also JNK and p38 perhaps via activation of G_{q/11}, PLC, genistein-insensitive tyrosine kinases, ras, B-raf and MEK1/2 (Gao, Chen, Weber and Linden; 1999). Studies in transfected cells show a nearly 100-fold higher potency of both NECA and adenosine in inducing ERK1/2 phosphorylation than in inducing cAMP production. The EC₅₀ value for ERK1/2 phosphorylation in transfected CHO lies in the nanomolar range, whereas cAMP production is half-maximally activated around 1-5 μM NECA. This emphasizes that G protein-coupled adenosine receptors can have substantially different potencies on different signaling pathways in the same cellular system. The adenosine A₃ receptor activates ERK1/2 in human fetal astrocytes and in transfected CHO cells (Schulte and Fredholm; 2000).

Adenosine A_{2A} receptors in striatum interact with dopaminergic mechanisms

In 1974 Kjell Fuxe and Urban Ungerstedt showed that theophylline could by itself induce the same type of rotation-behavior that was induced by drugs that directly or indirectly stimulated dopamine receptors and that it could markedly enhance dopamine-mediated effects (Fuxe and Ungerstedt; 1974). In that study the effect was interpreted as secondary to blockade of phosphodiesterase (PDE) and was therefore taken as evidence for an important role of cyclic AMP as a mediator of dopamine actions. However, in a follow-up study where I (BF) was involved several different PDE inhibitors were examined and it was found that the potency of the drugs fitted much better with their potency as adenosine antagonists (or enhancers) than their potency as PDE inhibitors (Fredholm, Fuxe and Agnati; 1976). Together these studies showed that methylxanthines, probably by blocking adenosine receptors, could potentially be used as treatment in PD.

Studies, in two laboratories, of dopamine stimulated adenylyl cyclase in brain also showed that methylxanthines could lower "basal" enzyme activity and that adenosine could stimulate it (Fredholm; 1977, Premont, Perez and Bockaert; 1977). This was observed in dopamine-rich areas of

the brain including caudate-putamen and tuberculum olfactorium, but not in other brain areas. This suggested that these parts of the brain might have a different set of adenosine receptors than other brain areas.

This contention received support during the following decade as methods to study receptors using binding techniques were developed. The first studies used relatively non-selective radioligands but pharmacological means to discriminate between multiple binding sites (Lee). Later studies used a rather selective ligand for A_{2A} receptors, including CGS 21680, (Alexander and Reddington; 1989, Jarvis, Jackson and Williams; 1989, Jarvis, Schulz, Hutchison, Do, Sills and Williams; 1989, Parkinson and Fredholm; 1990). Altogether these studies vindicated the belief that a special form of adenosine receptors, the A_{2A} receptor, is enriched in dopamine rich areas of the brain and that this offers a rationale for examining the role of adenosine in mediating or modulating behaviours and traits traditionally associated with dopamine.

The availability of more selective adenosine receptor agonists and antagonists also enforced the idea that behavioral consequences of adenosine- A_2 and dopamine-receptor mediated effects tended to be opposite (Fredholm, Herrera-Marschitz, Jonzon, Lindström and Ungerstedt; 1983, Heffner, Wiley, Williams, Bruns, Coughenour and Downs; 1989, Brown, Gill, Evenden, Iversen and Richardson; 1991).

The interactions between adenosine and dopamine receptors in striatum continued to be studied at the biochemical level. The A_{2A} receptor being coupled to a member of the G_s family of G proteins, and the D_2 receptor being coupled to a G_i protein would interact negatively at the level of second messengers and beyond. It was demonstrated that there were interactions between adenosine A_{2A} receptors at several levels. Using binding it was found that high affinity binding of D_2 agonists could be reduced by stimulation of adenosine A_{2A} receptors (Ferré, von Euler, Johansson, Fredholm and Fuxe; 1991). This finding suggested that there were interactions directly between the receptors (Figure 2), an issue that has been forcefully pursued by Kjell Fuxe and his colleagues.

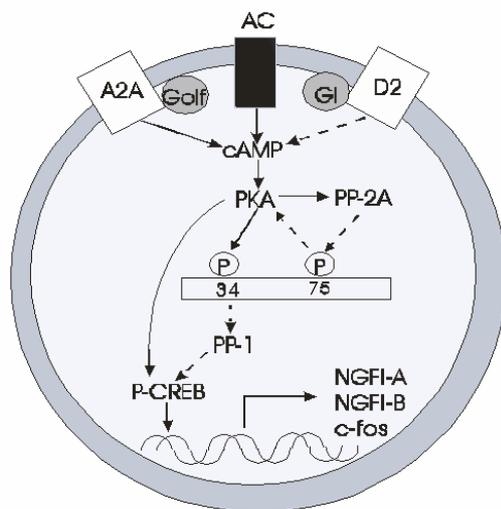


FIGURE 2. Schematic illustration of the interactions between adenosine and dopamine

The next major conceptual advance was the cloning of several adenosine receptors, as described above. These findings not only conclusively proved that there are two distinct adenosine A₂ receptors, but also provided a set of novel tools that proved very useful. In situ hybridisation was used to pinpoint the cells that express A_{2A} receptors in the brain. Using increasingly sophisticated methods it was proven that the bulk of A_{2A} expression is confined to one set of neurones in the striatum, namely those GABAergic output neurones that constitute the so-called indirect pathway (Schiffmann, Jacobs and Vanderhaeghen; 1991, Schiffmann, Libert, Vassart and Vanderhaeghen; 1991, Fink et al.; 1992, Johansson, Ahlberg, van der Ploeg, Brené, Lindefors, Persson and Fredholm; 1993, Pollack, Harrison, Wooten and Fink; 1993, Johansson, Georgiev and Fredholm; 1997, Svenningsson, Le Moine, Kull, Sunahara, Bloch and Fredholm; 1997). These cells also express the bulk of the dopamine D₂ receptors. Hence the link between A_{2A} and dopamine D₂ receptors was further strengthened.

Techniques with a cellular resolution were also used to try to determine the roles of adenosine A_{2A} receptors in the intact striatum. This was based

on early findings showing that expression of immediate early genes could be used to pinpoint changes in neuronal activity and/or signal transduction (Sheng and Greenberg; 1990). We observed that stimulatory doses of caffeine and selective A_{2A} receptor antagonists caused a decrease in the expression of IEGs, known to be regulated by the cAMP/CREB cascade, in striatopallidal neurons (Svenningsson, Nomikos and Fredholm; 1995, Svenningsson, Nomikos, Ongini and Fredholm; 1997). These and subsequent studies (Pinna, Wardas, Cozzolino and Morelli; 1999, Chen, Moratalla, Impagnatiello, Grandy, Cuellar, Rubinstein, Beilstein, Hackett, Fink, Low, Ongini and Schwarzschild; 2001) provide strong evidence that adenosine, via A_{2A} receptors, exert a robust tonic activation of the cAMP/CREB/IEG cascade in striatopallidal neurons. Moreover, this result also provided evidence that multiple D₂ receptor-mediated effects by dopamine can be attributed to an antagonism of this adenosine-mediated activation of striatopallidal neurons.

In order to increase our understanding of the interactions of adenosine and dopamine at the signal transduction level, we proposed a collaborative project with Paul Greengard to study the effects of adenosine A_{2A} selective compounds and caffeine on the phosphorylation of dopamine and cAMP phosphoprotein of 32 kDa (DARPP-32). DARPP-32 is highly enriched in all striatal GABAergic medium-sized projection neurons and is an important mediator of dopaminergic signaling (Greengard; 2001). Its function is determined by its relative phosphorylation state at several different threonine/serine residues, of which the most studied is a PKA-site Thr34. When this residue is phosphorylated it converts DARPP-32 into an inhibitor of protein phosphatase-1, which, in turn, regulates the activity of multiple transcription factors, including CREB, ion channels and ionotropic receptors (Fig 2). In initial studies conducted in brain slices prepared from striatum, it was found that CGS 21680 potently increases phosphorylation at Thr34 (Svenningsson, Lindskog, Rognoni, Fredholm, Greengard and Fisone; 1998). This effect was additive to that of SKF81297, a selective D₁ agonist, and could be counteracted by quinpirole, a selective D₂ agonist (Lindskog, Svenningsson, Fredholm, Greengard and Fisone; 1999). This result identified adenosine, via A_{2A} receptors, as a key regulator of the phosphorylation state of DARPP-32 in

striatopallidal neurons. Subsequently, we developed a method to reliably detect DARPP-32 phosphorylation *in vivo* and could demonstrate that the A_{2A} antagonist used, SCH 58261, significantly counteracted the increase in DARPP-32 phosphorylation that was observed following treatment with selective D_2 receptor antagonists (Svenningsson, Lindskog, Ledent, Parmentier, Greengard, Fredholm and Fisone; 2000). Likewise, the ability of D_2 antagonists to increase DARPP-32 phosphorylation was dramatically reduced in A_{2A} receptor KO mice. These data therefore provided further support for the notion that adenosine acting on A_{2A} receptors is an important mediator of establishing a basal cyclic AMP level, which is necessary for many effects of dopamine's action via D_2 receptors. In order to address the involvement of DARPP-32 in the behavioural actions of caffeine and selective adenosine A_{2A} receptor compounds, we administered such compounds to DARPP-32 KO and studied effects on locomotor behaviour. As expected from the biochemical data, it was found that the ability of CGS 21680 to induce hypolocomotion was attenuated in DARPP-32 KO mice (Lindskog, Svenningsson, Pozzi, Kim, Fienberg, Bibb, Fredholm, Nairn, Greengard and Fisone; 2002). Similarly, the ability of caffeine and SCH 58261 to induce hyperlocomotion was attenuated in DARPP-32 KO mice. In this paper, an additional effect of A_{2A} receptors on DARPP-32 phosphorylation was shown, namely that A_{2A} agonism via cAMP-dependent mechanisms increases the phosphorylation of Thr34-DARPP-32, but decreases the phosphorylation at Thr75-DARPP-32. Conversely, caffeine and SCH 58261 increase phosphorylation at Thr75-DARPP-32. This site has recently been shown to be phosphorylated by Cdk5 and when this happens DARPP-32 is converted into an inhibitor of PKA. Thus, by increasing the phosphorylation of Thr75-DARRP-32, caffeine and selective A_{2A} receptor antagonists will further increase the inhibition of PKA. This feed-forward mechanism, which is also utilized by D_2 receptor agonists, will therefore potentiate the inhibitory influence of adenosine on the cAMP/PKA/CREB/IEG signaling pathway in striatopallidal neurons (Fig 1d).

A_{2A} receptor antagonists and Parkinson's disease

In parallel with the development of an increasingly clear understanding of the biochemical and molecular underpinning of the adenosine-dopamine interactions there has been extensive work on the effectiveness of adenosine A_{2A} antagonists in various experimental models of PD. It will carry too far to try to present these results. However, a recent study showed that A_{2A} receptor antagonism could reduce not only symptoms of PD, but also the loss of dopamine neurons induced by MPTP (Chen, Xu, Petzer, Staal, Xu, Beilstein, Sonsalla, Castagnoli, Castagnoli Jr and Schwarzschild; 2001). Furthermore, it was shown that in fact persistent L-DOPA effects require A_{2A} receptors (Fredduzzi, Moratalla, Monopoli, Cuellar, Xu, Ongini, Impagnatiello, Schwarzschild and Chen; 2002).

Thus, over the years the concept that A_{2A} and D_2 receptors interact in such a way that A_{2A} antagonists could prove to be useful in PD has developed strongly. There are however concerns. One potential concern is related to tolerance. It is very well known that some actions of caffeine develop rapid tolerance (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig and Zvartau; 1999, Svenningsson, Nomikos and Fredholm; 1999). However, caffeine effects in PD models do not (Xu, Xu, Chen and Schwarzschild; 2002), and there is also no tolerance to selective A_{2A} antagonists in models that show tolerance to caffeine (Halldner, Lozza, Lindström and Fredholm; 2000).

Another, and perhaps more serious, concern is related to the fact that A_{2A} receptors regulate other things than activity in striatopallidal neurons. It has long been known that adenosine regulates platelet activation (Haslam and Cusack; 1981), and now we know that A_{2A} receptors are responsible for this (Ledent, Vaugeois, Schiffmann, Pedrazzini, El Yacoubi, Vanderhaeghen, Costentin, Heath, Vassart and Parmentier; 1997).

Similarly A_{2A} receptors are critically important in regulating neutrophil leucocyte activity (Cronstein; 1994), and activity of macrophages. Even more importantly A_{2A} receptors do regulate inflammatory reactions in general (Ohta and Sitkovsky; 2001). Therefore, long-term blockade of adenosine A_{2A} receptors might cause undesirable peripheral morbidity.

A potential way to attack this problem was afforded when it was discovered that A_{2A} receptors in striatum are coupled to G_{olf} proteins (Kull et al.; 2000), whereas on platelets, neutrophils and lymphocytes G_s

mediates the A_{2A} effects. If it proves possible to find agents that selectively affects A_{2A} - G_{olf} more selective drugs may be found.

Physiology of adenosine A_1 receptors as determined from studies using knock out mice

Even though quite selective agonists and antagonists are available for adenosine A_1 receptors (Fredholm, IJzerman, Jacobson, Klotz and Linden; 2001), and consequently much is known about their role in physiology and pathophysiology we embarked on a classical gene knock out strategy. The second coding exon was targeted as described (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001) and experiments were conducted on littermates from matings of heterozygote animals ($A1R +/-$) with a mixed C57Bl6/129OlaHsd background.

The offspring showed the expected frequency (1/4 $A1R +/+$; 2/4 $A1R +/-$ and 1/4 $A1R -/-$). There were no clear differences in the growth and maturation over the first five months between genotypes (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001), but subsequently +/- and, especially, -/- mice tended to die faster than their +/+ littermates (Giménez-Llort, Fernández-Teruel, Escorihuela, Fredholm, Tobena, Pekny and Johansson; 2002). So far we have not observed any major differences in fertility between genotypes, even though there is evidence that the A_1 receptor is involved in sperm capacitation.

$A1R +/-$ and $-/-$ mice showed no gross behavioural abnormalities. However, their grip strength, as judged by the so called wire hanger test, was reduced (Giménez-Llort et al.; 2002). This was somewhat surprising given the evidence that methylxanthines in doses that predominantly affect adenosine receptors appear, if anything, to increase muscle strength.

Although overall locomotor activity was unaltered in $A1R -/-$ mice (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001), we have found that the

increase in motor activity that accompanies transition from light to dark is reduced in the knockout mice (Giménez-Llort et al.; 2002). Surprisingly, A1R +/- mice were in this regard indistinguishable from wild-type animals. However, exploratory activity (assayed in the open field test and the hole-board) tended to be increased in the heterozygotes (Giménez-Llort et al.; 2002). This would tally with the known stimulatory effect of methylxanthines, including caffeine (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig and Zvartau; 1999).

The A1R -/- showed increased anxiety using two commonly used tests, the elevated plus maze and the dark-light box (Giménez-Llort et al.; 2002). This is interesting because hyperanxiety was also observed in A2A -/- mice (Ledent et al.; 1997). Future experiments will tell if the traits in the two strains is synergistic. It is also interesting to compare with the fact that high doses of caffeine that acts on A₁ and A_{2A} receptors produces anxiety in animals and man (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig and Zvartau; 1999). Using the resident intruder test A1R -/- mice also exhibited increased aggressiveness (Giménez-Llort et al.; 2002), again a trait also observed in A2A -/- mice (Ledent et al.; 1997). By contrast, no effect was observed when examining memory functions with the Morris water maze.

Using the hippocampal slice preparation the inhibitory adenosine effects were shown to be eliminated in A1R -/- mice (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001). This is an important finding since it shows that there are no important effects mediated via any of the other receptors in this preparation, despite the fact that important effects of both A_{2A} (Sebastiao and Ribeiro; 1996) and A₃ receptors (Dunwiddie, Diao, Kim, Jiang and Jacobson; 1997) has been reported. Another important finding was that the dose-response curve for adenosine was shifted significantly (two-fold) to the left in A1R +/- mice, which possess almost exactly half the normal number of receptors. This emphasises the important general point that potency of adenosine analogues is strongly dependent on the number of receptors. There were no adaptive changes in responses to GABA_B receptor activation or any adaptive changes in A_{2A} receptors.

Ever since the pioneering work of Berne and Gerlach a role for adenosine in mediating responses to hypoxia and ischemia has been postulated. We have so far examined the role of A₁ receptors in two such responses. In the hippocampal slice preparation responses to hypoxia include a fast decrease in responses to excitatory stimulation. We found that virtually all of this decrease was lost in slices from A1R ^{-/-} mice (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001). Furthermore, A1R ^{-/-} slices did not fully recover after hypoxia, as did A1R ^{+/+} slices. These findings clearly demonstrate that adenosine acting on A₁ receptors is critically important in regulating the responsiveness of neurons to decreased supply of metabolizable energy, enabling the neurons to survive such energy shortage.

A somewhat similar effect was observed when activity of respiratory neurons in the immature brainstem was studied. The normal depression of rate of spontaneous firing induced by hypoxia was lost or markedly reduced in A1R ^{-/-} mice. Also in this preparation the recovery seen in A1R ^{+/+} mice was less complete in A1R ^{-/-} brainstem neurons (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001).

Body temperature was similar in all genotypes, but the temperature lowering effect of adenosine analogues was less pronounced in A1R ^{+/-}, and, particularly, A1R ^{-/-} mice (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm; 2001).

It has long been known that adenosine can control pain (Sawynok and Sweeney; 1989) and adenosine receptors, particularly A₁ receptors, have been known to be present in spinal cord (Geiger et al.; 1984, Fastbom, Post and Fredholm; 1990). It was therefore no major surprise when we found that the analgesic effects of intrathecal adenosine analogues were essentially lost in A1R ^{-/-} mice (Johansson, Halldner, Dunwiddie, Masino, Poelchen, Giménez-Llort, Escorihuela, Fernández-Teruel, Wiesenfeld-Hallin, Xu, Hårdemark, Betsholtz, Herlenius and Fredholm;

2001). Somewhat more surprising was the finding that there was a clear hyperalgesia in these animals. This clearly suggests that adenosine acting at A₁ receptors constitute a significant endogenous analgesic mechanism.

The actions of adenosine are however mediated also by other adenosine receptors. Thus adenosine A_{2A} receptors, presumably located at sensory nerve endings, mediate hyperalgesia (Ledent et al.; 1997). A₃ receptors are – at least in mice – important as promoters of peripheral inflammation that leads to pain.

It has long been known that adenosine can decrease cardiac performance and reduce heart rate (Drury and Szent-György; 1929), and this effect, which is clinically relevant, is linked to A₁ receptors. The depressant effect of exogenous adenosine analogues was virtually eliminated in A1R -/- mice. It was therefore surprising that heart rate in A1R -/- mice proved to be similar to that in their wild type littermates.

Blood pressure in anaesthetised mice was elevated in the A1R -/- genotype (12 mm Hg), and there was even a tendency towards an elevated blood pressure in A1R +/- mice (5 mm Hg) (Brown, Ollerstam, Johansson, Skött, Fredholm and Persson; 2001). Since A1R -/- mice also had an elevated level of plasma renin a possible explanation is that the blood pressure elevation is due to angiotensin. However, an antagonist did not differ in its blood pressure lowering effect between genotypes (Brown, Ollerstam, Johansson, Skött, Fredholm and Persson; 2001). There were no major differences in blood vessel reactivity between genotypes, so we are still looking for the cause of the blood pressure increase. Given that the A2AR -/- genotype is also hypertensive (Ledent et al.; 1997) it will be interesting to know if the double knock-out shows a marked blood pressure elevation.

In preliminary studies we have found that isolated hearts from A1R -/- mice do not differ in their response to acute ischemia from hearts from their wild type littermates. However, we do see a markedly reduced protective effect of remote preconditioning. Ongoing studies aims at demonstrating the underlying mechanisms.

Sodium excretion was markedly (two-fold) elevated in both A1R +/- and -/- mouse kidneys (Brown, Ollerstam, Johansson, Skött, Fredholm and

Persson; 2001). This agrees with the known effects of caffeine and other adenosine receptor antagonists. By contrast, potassium excretion and glomerular filtration rate was unaltered. Most importantly, tubuloglomerular feedback is completely eliminated in A1R $-/-$ mice (Brown, Ollerstam, Johansson, Skött, Fredholm and Persson; 2001). These results emphasize that renal A₁ receptors constitute important drug targets.

Knock-out mice can be used not only to determine the role(s) of a particular gene product in physiology and pathophysiology, but also to determine the selectivity of drugs. So far we have finished a study that demonstrates that at least some of the effects of ATP (and other adenine nucleotides) in the hippocampus are in fact mediated by A₁ receptors, since the responses are completely eliminated in A1R $-/-$ mouse hippocampi. It will be important in the future to perform similar studies in other tissues, since adenine nucleotides are so very rapidly broken down at cell membranes generating high local concentrations of adenosine

REFERENCES

- (1) ÅDÉN, U., HERLENIUS, E., TANG, L.-Q. AND FREDHOLM, B.B. (2000) Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediat Res* 48: 177-83
- (2) ALEXANDER, S.P. AND REDDINGTON, M. (1989) The cellular localization of adenosine receptors in rat striatum. *Neuroscience* 28: 645-51
- (3) ARSLAN, G. AND FREDHOLM, B.B. (2000) Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A_{2A} receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci Lett* 292: 183-6
- (4) ATKINSON, M.R., TOWNSEND-NICHOLSON, A., NICHOLL, J.K., SUTHERLAND, G.R. AND SCHOLFIELD, P.R. (1997) Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A₃ receptor (ADORA3) gene. *Neurosci Res* 29: 73-9
- (5) AUGOOD, S.J. AND EMSON, P.C. (1994) Adenosine A_{2a} receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. *Brain Res Mol Brain Res* 22: 204-10
- (6) BODAS, E., ALEU, J., PUJOL, G., MARTIN-SATUÉ, M., MARSAL, J. AND SOLSONA, C. (2000) ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem* 275: 20268-73

- (7) BODIN, P. AND BURNSTOCK, G. (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26: 959-69
- (8) BROWN, R., OLLERSTAM, A., JOHANSSON, B., SKÖTT, O., FREDHOLM, B.B. AND PERSSON, A.E.G. (2001) Abolished tubuloglomerular feedback and increased renin release in adenosine A₁ receptor deficient mice. *Am J Physiol* 281: R1362-7
- (9) BROWN, S.J., GILL, R., EVENDEN, J.L., IVERSEN, S.D. AND RICHARDSON, P.J. (1991) Striatal A₂ receptor regulates apomorphine-induced turning in rats with unilateral dopamine denervation. *Psychopharmacology (Berl)* 103: 78-82
- (10) BRUNDEGE, J.M., DIAO, L., PROCTOR, W.R. AND DUNWIDDIE, T.V. (1997) The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36: 1201-10
- (11) CACIAGIL, F., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., BALLERINI, P. AND TACCONELLI, L. (1988) Cultures of glial cells release purines under field electrical stimulation: the possible ionic mechanisms. *Pharmacol Res Commun* 20: 935-47
- (12) CHEN, J.F., MORATALLA, R., IMPAGNATIELLO, F., GRANDY, D.K., CUELLAR, B., RUBINSTEIN, M., BEILSTEIN, M.A., HACKETT, E., FINK, J.S., LOW, M.J., ONGINI, E. AND SCHWARZSCHILD, M.A. (2001) The role of the D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor (A(2A)R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D(2) receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1970-5
- (13) CHEN, J.F., XU, K., PETZER, J.P., STAAL, R., XU, Y.H., BEILSTEIN, M., SONSALLA, P.K., CASTAGNOLI, K., CASTAGNOLI JR, N. AND SCHWARZSCHILD, M.A. (2001) Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: RC143.
- (14) CHU, Y.Y., TU, K.H., LEE, Y.C., KUO, Z.J., LAI, H.L. AND CHERN, Y. (1996) Characterization of the rat A_{2a} adenosine receptor gene. *DNA Cell Biol* 15: 329-37
- (15) CUNHA, R.A. (2001a) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38: 107-25
- (16) CUNHA, R.A. (2001b) Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res* 26: 979-91
- (17) CUNHA, R.A., SEBASTIÃO, A.M. AND RIBEIRO, J.A. (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A₁ receptors. *J Neurosci* 18: 1987-95
- (18) D'ALCANTARA, P., LEDENT, C., SWILLENS, S. AND SCHIFFMANN, S.N. (2001) Inactivation of adenosine A_{2A} receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* 107: 455-64

- (19) DICKENSON, J.M., BLANK, J.L. AND HILL, S.J. (1998) Human adenosine A1 receptor and P2Y2-purinoreceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells. *Br J Pharmacol* 124: 1491-9
- (20) DIXON, A.K., GUBITZ, A.K., SIRINATHSINGHI, D.J., RICHARDSON, P.J. AND FREEMAN, T.C. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118: 1461-8
- (21) DOOLETTE, D.J. (1997) Mechanism of adenosine accumulation in the hippocampal slice during energy deprivation. *Neurochem Int* 30: 211-23
- (22) DRURY, A.N. AND SZENT-GYÖRGY, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-37
- (23) DUNWIDDIE, T.V. AND DIAO, L. (1994) Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 537-45
- (24) DUNWIDDIE, T.V., DIAO, L. AND PROCTOR, W.R. (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7673-82
- (25) DUNWIDDIE, T.V., DIAO, L.H., KIM, H.O., JIANG, J.L. AND JACOBSON, K.A. (1997) Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 607-14
- (26) DUNWIDDIE, T.V. AND MASINO, S.A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55
- (27) DURING, M.J. AND SPENCER, D.D. (1992) Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol* 32: 618-24
- (28) FASTBOM, J., PAZOS, A. AND PALACIOS, J.M. (1987) The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* 22: 813-26
- (29) FASTBOM, J., POST, C. AND FREDHOLM, B.B. (1990) Antinociceptive effects and spinal distribution of two adenosine receptor agonists after intrathecal administration. *Pharmacol Toxicol* 66: 69-72
- (30) FERRÉ, S., FREDHOLM, B.B., MORELLI, M., POPOLI, P. AND FUXE, K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20: 482-7
- (31) FERRÉ, S., VON EULER, G., JOHANSSON, B., FREDHOLM, B.B. AND FUXE, K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7238-41
- (32) FINK, J.S., WEAVER, D.R., RIVKEES, S.A., PETERFREUND, R.A., POLLACK, A.E., ADLER, E.M. AND REPERT, S.M. (1992) Molecular cloning of the rat A₂

- adenosine receptor: selective co-expression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 14: 186-95
- (33) FRANCO, R., CASADÓ, V., CIRUELA, F., SAURA, C., MALLOL, J., CANELA, E.I. AND LLUIS, C. (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 52: 283-94
- (34) FREDDUZZI, S., MORATALLA, R., MONOPOLI, A., CUELLAR, B., XU, K., ONGINI, E., IMPAGNATIELLO, F., SCHWARZSCHILD, M.A. AND CHEN, J.F. (2002) Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A_{2A} adenosine receptors. *J Neurosci* 22: 1054-62
- (35) FREDHOLM, B.B. (1977) Activation of adenylate cyclase from rat striatum and tuberculum olfactorium by adenosine. *Med Biol* 55: 262-7
- (36) FREDHOLM, B.B. (1980) Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends Pharmacol Sci* 1: 129-32
- (37) FREDHOLM BB. Adenosine receptors. In *Understanding G protein-coupled receptors and their role in the CNS*. Pangalos MN, Davies CH. Oxford: Oxford University Press 2002, pp191-204.
- (38) FREDHOLM, B.B., BÄTTIG, K., HOLMÉN, J., NEHLIG, A. AND ZVARTAU, E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51: 83-153
- (39) FREDHOLM, B.B., CUNHA, R. AND SVENNINGSSON, P. (2003) Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors and therapeutic applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 413-26
- (40) FREDHOLM, B.B., FUXE, K. AND AGNATI, L. (1976) Effect of some phosphodiesterase inhibitors on central dopamine mechanisms. *Eur J Pharmacol* 38: 31-8
- (41) FREDHOLM, B.B., HERRERA-MARSCHITZ, M., JONZON, B., LINDSTRÖM, K. AND UNGERSTEDT, U. (1983) On the mechanism by which methylxanthines enhance apomorphine-induced rotation behaviour in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 535-41
- (42) FREDHOLM, B.B., IJZERMAN, A.P., JACOBSON, K.A., KLOTZ, K.-N. AND LINDEN, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-52
- (43) FREDHOLM, B.B., LINDSTRÖM, K. AND WALLMAN-JOHANSSON, A. (1994) Propentofylline and other adenosine transport inhibitors increase the efflux of adenosine following electrical or metabolic stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* 62: 563-73
- (44) FREDHOLM, B.B. AND SVENNINGSSON, P. (2002 Submitted) Adenosine-dopamine interactions development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* .

- (45) FURLONG, T.J., PIERCE, K.D., SELBIE, L.A. AND SHINE, J. (1992) Molecular characterization of a human brain adenosine A₂ receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 62-6
- (46) FUXE, K. AND UNGERSTEDT, U. (1974) Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med Biol* 52: 48-54
- (47) GAO, Z., CHEN, T., WEBER, M.J. AND LINDEN, J. (1999) A₂B adenosine and P₂Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 274: 5972-80
- (48) GIMÉNEZ-LLORT, L., FERNÁNDEZ-TERUEL, A., ESCORIHUELA, R.M., FRED-HOLM, B.B., TOBENA, A., PEKNY, M. AND JOHANSSON, B. (2002) Mice lacking the adenosine A₁ receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16: 547-50
- (49) GREENGARD, P. (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294: 1024-30
- (50) HAGBERG, H., ANDERSSON, P., LACAREWICZ, J., JACOBSON, I., BUTCHER, S. AND SANDBERG, M. (1987) Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 49: 227-31
- (51) HALLDNER, L., LOZZA, G., LINDSTRÖM, K. AND FREDHOLM, B.B. (2000) Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 406: 345-54
- (52) HASLAM RJ, CUSACK NJ. Blood platelet receptors for ADP and for adenosine. In Purinergic receptors. Burnstock G. London: Chapman and Hall 1981, pp221-85.
- (53) HEFFNER, T.G., WILEY, J.N., WILLIAMS, A.E., BRUNS, R.F., COUGHENOUR, L.L. AND DOWNS, D.A. (1989) Comparison of the behavioral effects of adenosine agonists and dopamine antagonists in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 31-7
- (54) HETTINGER, B.D., LEE, A., LINDEN, J. AND ROSIN, D.L. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A_{2A} receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J Comp Neurol* 431: 331-46
- (55) HIRANI, E., GILLIES, J., KARASAWA, A., SHIMADA, J., KASE, H., OPACKA-JUFFRY, J., OSMAN, S., LUTHRA, S.K., HUME, S.P. AND BROOKS, D.J. (2001) Evaluation of [4-O-methyl-(11)C]KW-6002 as a potential PET ligand for mapping central adenosine A(2A) receptors in rats. *Synapse* 42: 164-76
- (56) HIRANO, D., AOKI, Y., OGASAWARA, H., KODAMA, H., WAGA, I., SAKANAKA, C., SHIMIZU, T. AND NAKAMURA, M. (1996) Functional coupling of adenosine A_{2a} receptor to inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J* 316: 81-6

- (57) ISHIWATA, K., NOGUCHI, J., WAKABAYASHI, S., SHIMADA, J., OGI, N., NARIAI, T., TANAKA, A., ENDO, K., SUZUKI, F. AND SENDA, M. (2000) ¹¹C-labeled KF18446: a potential central nervous system adenosine A_{2a} receptor ligand. *J Nucl Med* 41: 345-54
- (58) JARVIS, M.F., JACKSON, R.H. AND WILLIAMS, M. (1989) Autoradiographic characterization of high affinity adenosine A₂ receptors in the rat brain. *Brain Res* 484: 111-8
- (59) JARVIS, M.F., SCHULZ, R., HUTCHISON, A.J., DO, U.H., SILLS, M.A. AND WILLIAMS, M. (1989) [³H]CGS 21680, a selective A₂ adenosine receptor agonist directly labels A₂ receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 888-93
- (60) JARVIS, M.F. AND WILLIAMS, M. (1988) Differences in adenosine A-1 and A-2 receptor density revealed by autoradiography in methylxanthine-sensitive and insensitive mice. *Pharmacol Biochem Behav* 30: 707-14
- (61) JOHANSSON, B., AHLBERG, S., VAN DER PLOEG, I., BRENÉ, S., LINDEFORS, N., PERSSON, H. AND FREDHOLM, B.B. (1993) Effect of long term caffeine treatment on A₁ and A₂ adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347: 407-14
- (62) JOHANSSON, B., GEROGIEV, V. AND FREDHOLM, B.B. (1997) Distribution and postnatal ontogeny of adenosine A_{2A} receptors in rat brain: comparison with dopamine receptors. *Neuroscience* 80: 1187-207
- (63) JOHANSSON, B., HALLDNER, L., DUNWIDDIE, T.V., MASINO, S.A., POELCHEN, W., GIMÉNEZ-LLORT, L., ESCORIHUELA, R.M., FERNÁNDEZ-TERUEL, A., WIESENFELD-HALLIN, Z., XU, X.-J., HARDEMARK, A., BETSHOLTZ, C., HERLENIUS, E. AND FREDHOLM, B.B. (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9407-12
- (64) KULL, B., SVENNINGSSON, P. AND FREDHOLM, B.B. (2000) Adenosine A_{2A} receptors are colocalized with and activate G_{olf} in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58: 771-7
- (65) LATINI, S. AND PEDATA, F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-84
- (66) LEDENT, C., VAUGEUIS, J.M., SCHIFFMANN, S.N., PEDRAZZINI, T., EL YACOUBI, M., VANDERHAEGHEN, J.J., COSTENTIN, J., HEATH, J.K., VASSART, G. AND PARMENTIER, M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Nature* 388: 674-8
- (67) LEE, K.S. AND REDDINGTON, M. (1986) Autoradiographic evidence for multiple CNS binding sites for adenosine derivatives. *Neuroscience* 19: 535-49
- (68) LEE, Y.C., CHANG, C.W., SU, C.W., LIN, T.N., SUN, S.H., LAI, H.L. AND CHERN, Y. (1999) The 5' untranslated regions of the rat A_{2A} adenosine receptor gene function as negative translational regulators. *J Neurochem* 73: 1790-8

- (69) LIBERT, F., SCHIFFMANN, S.N., LEFORT, A., PARMENTIER, M., GERARD, C., DUMONT, J.E., VANDERHAEGHEN, J.J. AND VASSART, G. (1991) The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J* 10: 1677-82
- (70) LINDSKOG, M., SVENNINGSSON, P., FREDHOLM, B.B., GREENGARD, P. AND FISONE, G. (1999) Activation of dopamine D₂ receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience* 88: 1005-8
- (71) LINDSKOG, M., SVENNINGSSON, P., POZZI, L., KIM, Y., FIENBERG, A.A., BIBB, J.A., FREDHOLM, B.B., NAIRN, A.C., GREENGARD, P. AND FISONE, G. (2002) Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* 418: 774-8
- (72) LONDOS, C., COOPER, D.M. AND WOLFF, J. (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2551-4
- (73) MAENHAUT, C., VAN SANDE, J., LIBERT, F., ABRAMOWICZ, M., PARMENTIER, M., VANDERHAEGEN, J.J., DUMONT, J.E., VASSART, G. AND SCHIFFMANN, S. (1990) RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 1169-78
- (74) MAHAN, L.C., MCVITTIE, L.D., SMYK-RANDALL, E.M., NAKATA, H., MONSMA JR, F.J., GERFEN, C.R. AND SIBLEY, D.R. (1991) Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 40: 1-7
- (75) MARTÍNEZ-MIR, M.I., PROBST, A. AND PALACIOS, J.M. (1991) Adenosine A2 receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. *Neuroscience* 42: 697-706
- (76) MIRABET, M., MALLOL, J., LLUIS, C. AND FRANCO, R. (1997) Calcium mobilization in Jurkat cells via A2b adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 122: 1075-82
- (77) MITCHELL, J.B., LUPICA, C.R. AND DUNWIDDIE, T.V. (1993) Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci* 13: 3439-47
- (78) NOGUCHI, J., ISHIWATA, K., FURUTA, R., SIMADA, J., KIYOSAWA, M., ISHII, S., ENDO, K., SUZUKI, F. AND SENDA, M. (1997) Evaluation of carbon-11 labeled KF15372 and its ethyl and methyl derivatives as a potential CNS adenosine A1 receptor ligand. *Nucl Med Biol* 24: 53-9
- (79) OHTA, A. AND SITKOVSKY, M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916-20
- (80) PARKINSON, F.E. AND FREDHOLM, B.B. (1990) Autoradiographic evidence for G-protein coupled A₂-receptors in rat neostriatum using [³H]-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342: 85-9

- (81) PINNA, A., WARDAS, J., COZZOLINO, A. AND MORELLI, M. (1999) Involvement of adenosine A2A receptors in the induction of C-Fos expression by clozapine and haloperidol. *Neuropsychopharmacology* 20: 44-51
- (82) POLLACK, A.E., HARRISON, M.B., WOOTEN, G.F. AND FINK, J.S. (1993) Differential localization of A2a adenosine receptor mRNA with D1 and D2 dopamine receptor mRNA in striatal output pathways following a selective lesion of striatonigral neurons. *Brain Res* 631: 161-6
- (83) PREMONT, J., PÉREZ, M. AND BOCKAERT, J. (1977) Adenosine-sensitive adenylate cyclase in rat striatal homogenates and its relationship to dopamine- and Ca²⁺-sensitive adenylate cyclases. *Mol Pharmacol* 13: 662-70
- (84) REN, H. AND STILES, G.L. (1995) Separate promoters in the human A1 adenosine receptor gene direct the synthesis of distinct messenger RNAs that regulate receptor abundance. *Mol Pharmacol* 48: 975-80
- (85) REN, J. AND STILES, G. (1994) Characterization of the human A₁ adenosine receptor gene. *J Biol Chem* 269: 3104-10
- (86) REPERT, S.M., WEAVER, D.R., STEHLE, J.H. AND RIVKEES, S.A. (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol* 5: 1037-48
- (87) RICHARDSON, P.J., DIXON, A.K., LEE, K., BELL, M.I., COX, P.J., WILLIAMS, R., PINNOCK, R.D. AND FREEMAN, T.C. (2000) Correlating physiology with gene expression in striatal cholinergic neurones. *J Neurochem* 74: 839-46
- (88) ROSIN, D.L., ROBEVA, A., WOODARD, R.L., GUYENET, P.G. AND LINDEN, J. (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 401: 163-86
- (89) SALVATORE, C.A., JACOBSON, M.A., TAYLOR, H.E., LINDEN, J. AND JOHNSON R.G. (1993) Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10365-9
- (90) SAWYNOK, J. AND SWEENEY, M.I. (1989) The role of purines in nociception. *Neuroscience* 32: 557-69
- (91) SCHIFFMANN, S.N., JACOBS, O. AND VANDERHAEGHEN, J.J. (1991) Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J Neurochem* 57: 1062-7
- (92) SCHIFFMANN, S.N., LIBERT, F., VASSART, G. AND VANDERHAEGHEN, J.J. (1991) Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci Lett* 130: 177-81
- (93) SCHINDLER, M., HARRIS, C.A., HAYES, B., PAPOTTI, M. AND HUMPHREY, P.P. (2001) Immunohistochemical localization of adenosine A1 receptors in human brain regions. *Neurosci Lett* 297: 211-5

- (94) SEBASTIAO, A.M. AND RIBEIRO, J.A. (1996) Adenosine A₂ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* 48: 167-89
- (95) SEIDEL, M.G., KLINGER, M., FREISSMUTH, M. AND HOLLER, C. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J Biol Chem* 274: 25833-41
- (96) SEXL, V., MANCUSI, G., HOLLER, C., GLORIA-MAERCKER, E., SCHUTZ, W. AND FREISSMUTH, M. (1997) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A_{2A}-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 5792-9
- (97) SHENG, M. AND GREENBERG, M.E. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-85
- (98) SHIMADA, Y., ISHIWATA, K., KIYOSAWA, M., NARIAL, T., ODA, K., TOYAMA, H., SUZUKI, F., ONO, K. AND SENDA, M. (2002) Mapping adenosine A(1) receptors in the cat brain by positron emission tomography with [(11)C]MPDX. *Nucl Med Biol* 29: 29-37
- (99) STEHLE, J.H., RIVKEES, S.A., LEE, J.J., WEAVER, D.R., DEEDS, J.D. AND REPERT, S.M. (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A₂-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 6: 384-93
- (100) STONE-ELANDER, S., THORELL, J.-O., ERIKSSON, L., FREDHOLM, B.B. AND INGVAR, M. (1997) *In vivo* biodistribution of [N-¹¹C-methyl]KF 17837 using 3D-PET: Evaluation as a ligand for the study of adenosine A_{2A} receptors. *Nucl Med Biol* 24: 187-91
- (101) SVENNINGSSON, P. AND FREDHOLM, B.B. (2002) Exciting news about A_{2A} receptors. *Supplement of Neurology* .
- (102) SVENNINGSSON, P., HALL, H., SEDVALL, G. AND FREDHOLM, B.B. (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: An extended autoradiographic study. *Synapse* 27: 322-35
- (103) SVENNINGSSON, P., LE MOINE, C., FISONE, G. AND FREDHOLM, B.B. (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Prog Neurobiol* 59: 355-96
- (104) SVENNINGSSON, P., LE MOINE, C., KULL, B., SUNAHARA, R., BLOCH, B. AND FREDHOLM, B.B. (1997) Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience* 80: 1171-85
- (105) SVENNINGSSON, P., LINDSKOG, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., GREENGARD, P., FREDHOLM, B.B. AND FISONE, G. (2000) Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa *in vivo* by dopamine D₁, dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1856-60

- (106) SVENNINGSSON, P., LINDSKOG, M., ROGNONI, F., FREDHOLM, B.B., GREENGARD, P. AND FISIONE, G. (1998) Activation of adenosine A_{2A} and dopamine D₁ receptors stimulates cyclic AMP-dependent phosphorylation of DARPP-32 in distinct populations of striatal projection neurons. *Neuroscience* 84: 223-8
- (107) SVENNINGSSON, P., NOMIKOS, G.G. AND FREDHOLM, B.B. (1995) Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J Neurosci* 15: 7612-24
- (108) SVENNINGSSON, P., NOMIKOS, G.G. AND FREDHOLM, B.B. (1999) The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J Neurosci* 19: 4011-22
- (109) SVENNINGSSON, P., NOMIKOS, G.G., ONGINI, E. AND FREDHOLM, B.B. (1997) Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79: 753-64
- (110) XU, K., XU, Y.H., CHEN, J.F. AND SCHWARZSCHILD, M.A. (2002) Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. *Neurosci Lett* 322: 13-6
- (111) ZIMMERMANN, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309

Anal. Real Acad. Nal. Farm. 2003, 69:

Revisión

Aspectos epidemiológicos de la intoxicación por toxina diarreica de los moluscos (DSP)*

JUAN JESÚS GESTAL OTERO

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Tras un recuerdo histórico, se estudia la epidemiología de la intoxicación por DSP, destacando su importancia económica y sanitaria. Se revisa su incidencia en Europa, Asia y América, y la disminución de brotes en población tras el establecimiento de Programas de Vigilancia y Control.

Se estudian las toxinas del grupo DSP (ácido okadaico y otras dinophysistoxinas; pectenotoxinas y yessotoxinas) y los principales dinoflagelados productores (*Dinophysis* y *Prorocentrum*), y el papel de los mejillones y vieiras en su transmisión, así como la dificultad y los factores que influyen en su detoxificación.

Se describen y analizan los factores que influyen en la aparición de mareas rojas: nutrientes, temperatura, luz solar, salinidad, materia orgánica, metales y quelantes, sustancias promotoras del crecimiento, estado de la mar y vientos dominantes.

Finalmente se estudian las medidas de prevención primaria (vigilancia en el mar y en el mercado) y secundarias (actuaciones ante un brote), describiendo el Programa de Control de Biotoxinas Marinas de Galicia, y la normativa Europea.

Palabras clave: Toxinas diarreicas de los moluscos.— Intoxicación.— Cadena epidemiológica.— Mareas rojas.— Dinoflagelados.— Prevención.— Programa de vigilancia de biotoxinas marinas.— Red de alerta de mareas rojas.— Normativa europea.— Investigación epidemiológica de brotes.

* Discurso de ingreso pronunciado el día 17 de octubre de 2002 en su toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

SUMMARY

Epidemiological aspects of the diarrheic shellfish poisoning (DSP)

After a brief introduction on its history, we study the epidemiology of the diarrheic shellfish poisoning, emphasizing its economical and health-related impact. We review the incidence of the disease in Europe, Asia and America, and the decrease of the number of outbreaks after implementation of the Programs of Surveillance and Control.

We study the DSP-group toxins (okadaic acid and other dinophysistoxins, pectenotoxins and yessotoxins) and the main dinoflagellates that produce these toxins (*Dinophysis* y *Prorocentrum*). Furthermore, we study the role played by mussels and scallops in the transmission as well as the difficulty and factors related to their detoxination.

We describe and analyze those factors that influence the occurrence of red tides: nutrients, temperature, sunlight, salinity, organic matter, metals and chelants, growth-promoting substances, sea conditions and dominant winds.

We finally describe the actions related to primary prevention (sea and market surveillance) and secondary prevention (actions against an outbreak). We also describe the Galician Control Program of Biotoxins as well as the European norms.

Key Works: Diarrheic shellfish poison (DSP).— Epidemiology chain.— Red tide.— Prevention.— Marine biotoxins monitoring program.— Red tide warning network.— European regulations.— Epidemiological investigation of DSP outbreak

INTRODUCCIÓN

Existen referencias que hacen pensar en el conocimiento desde épocas remotas de las intoxicaciones relacionadas con el consumo de peces y moluscos.¹⁻⁶

En Europa ya hay descripciones científicas de brotes de intoxicación paralítica desde 1689⁴⁻⁵, si bien el conocimiento con exactitud de su vinculación con los mejillones no va a tenerse hasta 1927, con motivo de un envenenamiento que tuvo lugar en la costa central de California, conduciendo los estudios posteriores (1937) de Meyer y Sommer⁷⁻⁸ al descubrimiento de su causa, los dinoflagelados y sus toxinas, y al inicio de su estudio con profundidad. Halstead³ recopiló los casos publicados en la literatura mundial hasta 1965.

Todos estos episodios se refieren a intoxicaciones por toxinas paralizantes. El conocimiento de las toxinas causantes de procesos diarreicos es mas reciente.

El primer episodio de intoxicación diarreica asociada al consumo de mejillones tóxicos del que se tiene referencia ocurrió en el área de Easterscheldt en Holanda, en 1961.⁹ Ese mismo año también ocurrieron otros casos en Waddensea. El siguiente brote en Easterscheldt ocurrió en 1971 y afectó a 100 personas. Existe también referencia de otro episodio por ingesta de mejillón del atlántico (*Mytilus edulis*) en Noruega en 1968,¹⁰ comunicándose en los años siguientes varios casos en el fiordo de Oslo. Fueron catalogados como envenenamiento por mejillones no identificado.

En octubre de 1976 enfermaron en Holanda 25 personas después de consumir mejillones procedentes de Waddensea.¹¹ Ese mismo año Yasumoto, Oshima y Yamaguchi describieron por vez primera la toxina diarreica en un brote de intoxicación alimentaria por ingesta de mejillones y vieiras ocurrido en el Nordeste de Japón.¹²

Nosotros, en 1976, atendimos los primeros casos de intoxicación paralítica por moluscos ocurridos en la provincia de A Coruña,¹³ y en el verano de 1978 estudiamos una serie de episodios diarreicos en varias poblaciones de la Ría de Ares, en concreto en la localidad de Lorbé (municipio de Oleiros), próxima a la ciudad de A Coruña, asociados con el consumo de mejillones. Comprobamos que no existía causa microbiológica y lo atribuimos a una toxina desconocida adquirida por dichos moluscos en sus zonas de cultivo, como en años anteriores había ocurrido con la toxina paralítica de los moluscos (PSP).

En los veranos siguientes volvimos a asistir y a estudiar epidemiológicamente brotes similares, caracterizados clínicamente, tras un período de incubación de pocas horas, por diarrea, nauseas, vómitos y dolor abdominal, ausencia de fiebre y asociación con el consumo de mejillones abiertos al vapor. Los pacientes se recuperaban en dos o tres días.

En 1981, se produjo la probablemente mayor intoxicación diarreica asociada al consumo de mejillones, afectando aproximadamente

a 5000 personas en toda España, siendo la ciudad de Madrid la más afectada. De nuevo los estudios epidemiológicos asociaron diarrea y mejillones. Por entonces ya se conocían los trabajos de Kat¹¹ y Yasumoto.^{12,14-15} Estas intoxicaciones producidas en Galicia así como en el resto de España por la toxina diarrea se encuadraban perfectamente dentro del marco de las ocurridas en el Japón en los años 1976 y 1977,^{12, 14, 16} y con anterioridad y posterioridad en muchos países de Europa, Asia y América fundamentalmente.

En los informes de los sucesos ocurridos en Japón por el consumo de mejillones contaminados con toxina, Yasumoto et al^{12,14} señalaron que se trataba de una toxina lipófila; que en trabajos posteriores denominaron toxina diarrea de los moluscos o DSP (Diarrheic Shellfish Poison).¹⁵

EPIDEMIOLOGIA DE LAS INTOXICACIONES POR DSP

La intoxicación por DSP tiene una amplia distribución geográfica afectando particularmente a Japón y al noroeste de Europa y supone un serio problema no solo para la salud pública sino también económico para la industria de los moluscos e incluso el turismo.

Es un problema de difícil solución, pues el procedimiento utilizado en las depuradoras de moluscos no afecta al contenido en biotoxinas.

Las intoxicaciones por DSP tienen importantes repercusiones económicas. Galicia produce en sus 3.400 bateas el 95% del mejillón de España, algo más de 250.000 toneladas al año, con un valor cercano a los 125 millones de euros lo que la sitúa como primera productora europea por delante de Francia e Italia, y segunda productora mundial por detrás de China (400.000 toneladas), pero a diferencia de esta, que escasamente cubre su demanda interna, el 80% de la producción de Galicia se destina a mercados externos a la Comunidad, siendo el 25% exportado a terceros países. Supone el 21% de la producción pesquera (pesca fresca) en primera venta.

La presentación de mareas rojas tóxicas supone el cierre de la extracción de moluscos de los polígonos de cultivo afectados, y de mantenerse mucho tiempo la situación un grave quebranto para la economía de gran número de familias que directa o indirectamente dependen de esta actividad económica. El sector genera más de 22.000 puestos de trabajo, 13.000 de ellos directos.

Desde principios de los años 80, y muy especialmente a partir de su segunda mitad, se observó en Galicia un progresivo incremento de los episodios de toxicidad de origen fitoplanctónico en moluscos bivalvos. Llegando en algunas zonas y años a superar los 200 días/año de prohibición de extracción del mejillón.

Desde el punto de vista sanitario las intoxicaciones por DSP tienen importancia no solo por sus efectos agudos (cuadro leve de gastroenteritis, sin letalidad, que en tres días evoluciona hacia la recuperación total), sino también por los posibles efectos crónicos todavía no bien conocidos. Se ha comprobado que la dinofisistoxina-1 es un potente promotor de tumores, y dado que el estomago, el intestino delgado y el colon tienen receptores para el ácido okadaico (la dinophysistoxina 1 es el 35-R-metil ácido okadaico), pudiera tener implicaciones en el crecimiento de tumores gastrointestinales.¹⁶⁻¹⁷ También se han descrito efectos mutagénicos¹⁸ e inmunotóxicos debido a una marcada supresión de la producción de interleukina-1 (IL-1) en los monocitos¹⁹.

En animales de experimentación se ha demostrado que otro componente del grupo, la pectenotoxina-1 (PTX1), es hepatotóxica e induce necrosis aguda de los hepatocitos, con una acción patológica similar a la de la faloidina. El hígado de ratones inyectados intraperitonealmente con pectenotoxinas aparece finamente granulado y los hepatocitos contienen numerosas vacuolas.

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN

La incidencia real de la intoxicación humana por DSP es difícil de conocer, ya que por su clínica puede confundirse con diarreas de otros orígenes y por su evolución benigna quedar sin filiar, por ello los casos aislados suelen pasar desapercibidos y tan solo se tiene conocimiento de

los brotes que en muchos países son de declaración obligatoria. En la actualidad, la aparición de casos de intoxicación humana es algo que no debe ocurrir y pone en evidencia un grave fallo de todo el proceso de vigilancia y prevención.

La investigación en los brotes humanos tan solo aporta de cara a la prevención la determinación de su origen y la posible exposición de otros grupos de personas a moluscos de dicha procedencia. Lo que realmente tiene un interés mayor de cara a la prevención es la vigilancia y detección temprana de los episodios tóxicos en el mar que permita la adopción de medidas (prohibición de la extracción de moluscos en las áreas afectadas e información de la población para que no los consuma).

Si bien en los países en los que esta red de vigilancia no sea posible establecerla, la vigilancia basada en la detección precoz de casos de intoxicación humana, puede servir para detectar el problema y establecer medidas preventivas que eviten su incremento.

Incidencia

La incidencia de episodios de toxicidad por DSP en humanos, en estos últimos veinte años, ha disminuido y prácticamente desaparecido en los países desarrollados en donde, como respuesta a la aparición del problema, se han establecido redes de vigilancia de la presencia de especies de plancton tóxicas y de toxicidad en los moluscos.

Sin embargo los episodios de toxicidad en el mar han aumentado y esto se debe, en parte, a un mejor conocimiento del tema y al establecimiento de buenos programas de vigilancia, pero también a su extensión a nuevas áreas geográficas, a veces muy distantes, favorecida por el incremento del comercio internacional de productos pesqueros y la posibilidad de que con ellos viajen quistes de especies de plancton exóticas, productoras de toxinas, que se asentarían en estas nuevas zonas en donde no se las conocía. Esto convierte al problema de las ficotoxinas en un problema de salud pública de alcance mundial.

La intoxicación aunque tiene una amplia distribución mundial, afectando áreas templadas y tropicales, son Europa y Japón las áreas más

afectadas. También se han descrito episodios en otras partes del mundo (Australia, Nueva Zelanda, Indonesia).²⁰

Brotos en Europa

En Francia se han comunicado varios brotes de intoxicación por DSP a lo largo de los años 80 que afectaron a gran número de personas.²¹⁻²² Desde el establecimiento de la red de vigilancia en 1984, se ha observado un aumento en la frecuencia de mareas tóxicas así como su extensión a áreas no contaminadas anteriormente.

Desde octubre de 1984 a abril de 1985, ocurrió el primer brote documentado en Noruega²³, en el que se produjeron alrededor de 400 casos en personas que vivían en la costa suroeste. Coincidiendo con este brote, se produjo otro, en octubre de 1984, en la costa occidental de Suecia, en donde ya se habían producido episodios de DSP desde 1983, afectándose un centenar de personas.²⁴ En 1986-87 se estableció en Noruega un Programa de Vigilancia de toxinas DSP. En Dinamarca desde 1990, año en el que se inició la vigilancia, se han detectado en muchos veranos mejillones con DSP.

En España los primeros casos se produjeron, como comentamos anteriormente, en 1978 en la Ría de Ares,²⁵ ocurriendo nuevos episodios en los años posteriores siendo el más importante el de 1981 en el que se produjeron 5000 casos. A partir de entonces se detecta regularmente en el mar.

El primer evento en Italia ocurrió en 1989 y afectó las costas norte y noroeste del Adriático. En Alemania, en septiembre de 1978 fue declarado un caso de intoxicación en el área de Husum. En noviembre de 1986 se intoxicaron al menos 8 personas. Desde 1986 se ha detectado regularmente DSP en los estuarios, pero no grandes brotes,²¹ al igual que en Portugal e Irlanda.

En Portugal desde 1987, año en el que se detectó por primera vez, han venido detectándose toxinas DSP en bivalvos en las costas del norte, incluyendo los estuarios de Aveiro y el Mondego. En Irlanda desde que se estableció el programa de vigilancia se ha detectado casi todos los años DSP en muestras de moluscos, variando la severidad y duración del

cierre de los parques de cultivo de unos años a otros. La ocurrencia tiene lugar en los meses de verano y otoño (de junio a diciembre). Un refrán gallego dice así: “*De outubro ata San Simón non probes o mexillón*”

Brotos en Asia

Los primeros episodios de intoxicación por DSP en Asia, debidos a ingestión de mejillón atlántico y vieiras tóxicas, son los referidos anteriormente, que habían ocurrido en las costas del nordeste de Japón en 1976 y 1977^{12, 14} afectando a 164 personas. Con posterioridad se produjeron nuevos brotes. En el período 1976-1984, Kawabata refiere que se produjeron 34 brotes afectándose 1257 personas.²⁶ Las costas japonesas son junto con las europeas las más afectadas por floraciones tóxicas.

También se han descrito mareas rojas tóxicas en la costa este de Rusia (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii* y *D. norvergica*),²⁷ y la presencia de toxina DSP en moluscos de la India,²⁸ si bien no se han comunicado casos humanos.

Brotos en América

El primer episodio documentado de intoxicación por DSP en América del Norte se produjo en 1990 en Nueva Escocia, costa este de Canadá, y fue debido a DTX-1. En él se afectaron 16 personas.²⁹ Ocurriendo otros con posterioridad en la misma costa.³⁰ En 1989 ya se había detectado en Long Island (EE.UU.) una marea roja (elevado número de *D. acuminata*) con baja toxicidad en los moluscos (0,5 Unidades Ratón), sin que se notificasen casos humanos.³¹ También se ha detectado en Chile (1991)³², y en Uruguay (1992).³³

CADENA EPIDEMIOLOGICA

El reservorio y fuente de la intoxicación son los dinoflagelados productores de DSP; el mecanismo de transmisión los moluscos bivalvos con toxina, fundamentalmente mejillones aunque también pueden serlo las vieiras, y los sujetos susceptibles las personas que los ingieren, generalmente personas con bajo nivel de educación sanitaria, que residen

en zonas costeras y tienen el hábito de ingerir moluscos, y más si estos son recogidos directamente de las rocas y no pasan control sanitario, lo que incrementa el riesgo.

Agente causal:

El grupo de la DSP lo conforman tres grupos de toxinas: el ácido okadaico y otras Dinophysistoxinas (DTX); las Pectenotoxinas (poliésteres lactónicos), y las Yessotoxinas (YTS), toxinas con grupos sulfato, si bien algunos³⁴ sugieren que estas últimas no debieran incluirse en este grupo dado que no causan diarrea y son menos tóxicas por vía oral que las dinophysistoxinas y pectenotoxinas. También difieren en su etiología, las yessotoxinas son producidas por *Protoceratium reticulatum*³⁵ y sus análogos homoYTS por *Lingulodinium polyedrum*.³⁶

La primera toxina detectada en el hepatopáncreas de los mejillones tóxicos se denominó Dinophysistoxina 1 (DTX1)³⁷ nombre derivado de la especie planctónica *Dinophysis*, al haber sido el *D. fortii* el primero que se demostró responsable de la toxicidad de los mejillones.³⁸ Posteriormente se confirmó también toxicidad en los *D. acuta*, *D. norvergica*, *D. acuminata*, *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. tripos*.³⁹ Un dinoflagelado bentónico como el *Prorocentrum lima* también produce la misma toxina,⁴⁰ y puede encontrarse en las áreas de cultivo de moluscos.

Mediante análisis espectroquímico se comprobó que la DTX1 era un metil derivado del ácido okadaico (el 35-R-metil ácido okadaico), cuyo nombre proviene de haber sido aislado por primera vez de la esponja *Halichondria okadai* en 1981⁴⁰.

Posteriormente se identificaron otros derivados el DTX3 (7-O-acil-DXT1) en una intoxicación por vieiras en el nordeste de Japón,⁴¹ y el DTX2 (un isómero del ácido okadaico) en mejillones.⁴² El DTX3 está ausente en el plancton, formándose por acilación del 7-OH en el molusco, el ácido graso más común es el palmítico.

La Pectenotoxin 1 (PTX1), una poliéster lactona, debe su nombre a haber sido aislada de la glándula digestiva de la vieira *Patinopecten yessoensis* en el nordeste del Japón⁴¹ describiéndose posteriormente

diversos homólogos (PTX2, PTX3, PTX6, PTX4 y PTX6, PTX7, PTX8, PTX9 y PTX10).⁴³ La Yessotoxina fue aislada de vieiras y tiene una estructura relacionada con las ciguatoxinas y brevetoxinas.⁴⁴

De todas estas toxinas tan solo el ácido okadaico y sus derivados (DTX) tienen toxicidad aguda de tipo gastrointestinal. El OA y las DTX han mostrado ser potentes inhibidores de la actividad de las proteínofosfatasas 2A, 1 y 2B las principales proteínofosfatasas del citosol de las células de los mamíferos, con el consiguiente aumento de proteínas fosforiladas.⁴⁵ El ácido okadaico causa probablemente diarrea al estimular la fosforilación de proteínas que controlan la secreción de sodio por las células intestinales.⁴⁶⁻⁴⁸

Las pectenotoxinas y las yessotoxinas aunque no producen cuadros diarreicos se incluyen en el complejo DSP por su común propiedad de solubilidad en lípidos, y están sometidas a las mismas normas legales que el AO y derivados.

El ácido okadaico es la toxina predominante en la mayoría de los países europeos si bien la DTX2 se ha comunicado en Irlanda,^{42, 49} España⁵⁰ y Portugal.

Reservorio y fuente de la intoxicación

En 1989 se identificaron los dinoflagelados del género *Dinophysis* (predominantes en Europa Occidental) y posteriormente del género *Prorocentrum* (más frecuentes en Japón) como los organismos responsables de la producción de la toxina.

Las especies *D. acuminata* y *D. acuta* son las más extendidas en las aguas de Europa.⁵¹⁻⁵³ La *D. acuminata* es el principal componente en las más importantes floraciones de algas de la costa noroeste de Francia. En Italia también se ha identificado *D. fortii* como agente tóxico,⁵⁴ y en Noruega el *D. norvergica*⁵⁵ simultáneamente con *D. acuminata*, *D. acuta* y *P. micans*.

Su aparición incluso en pequeñas concentraciones (cientos de células por litro) conduce a la toxificación de los moluscos. La ingesta de estos o de peces que previamente han depredado a pequeños peces

herbívoros que habían pastado algas tóxicas, produce la intoxicación en humanos.

En España los episodios tóxicos de DSP en las rías gallegas aparecen asociados principalmente a proliferaciones de *D. acuminata* y *D. acuta*, si bien en ciertos momentos otras especies como *D. caudata*, *D. tripos* y *D. rotundata* pueden contribuir de forma significativa a los niveles de toxinas diarreicas detectadas.

Mecanismo de transmisión

Los moluscos bivalvos, principalmente el mejillón y también, aunque con menor frecuencia, la vieira, son los vectores de la toxina. La adquieren cuando en el plancton, con el que se alimentan, existen especies de dinoflagelados tóxicos.

El 95% de la toxina se acumula en el hepatopáncreas del mejillón sin sufrir ningún cambio químico y, aparentemente, no afecta a sus funciones fisiológicas ni a sus propiedades organolépticas. La cantidad de toxina retenida dependerá no solo del número de dinoflagelados presentes en el medio y de su carga tóxica, sino también de la cantidad de agua filtrada por el molusco.

Los tratamientos culinarios ordinarios, tanto en el ámbito doméstico como en el industrial (cocción, congelación, preparación en conserva) no destruyen la toxina.^{13, 56-58} De momento no existe ningún método eficaz que permita eliminar de los mejillones y de otros bivalvos las toxinas de forma suficientemente económica y rápida, que resulte rentable y permita su comercialización sin peligro. La única solución es la auto depuración o detoxificación natural mediante la metabolización de las toxinas.

En tanto la acumulación de toxina en los moluscos puede no necesitar más que algunos días, su eliminación precisa de varias semanas y en algunas ocasiones de meses. El proceso de detoxificación depende de diversos factores, unos dependientes del molusco y otros del medio ambiente.

La temperatura y el alimento disponible pueden ser considerados como los dos factores externos más importantes que determinan la

velocidad de desintoxicación. En aguas templadas o cálidas, la filtración del mejillón es más activa, y por tanto la ingestión de alimento nuevo y eliminación de residuos antiguos se producirá con mucha mayor rapidez. El disponer de abundante alimento no tóxico es requisito indispensable para que el bivalvo pueda volver a una situación similar a la de antes del episodio tóxico.

Con frecuencia los episodios tóxicos tienen lugar durante el otoño, y puede llegar el invierno sin que la toxina haya desaparecido totalmente del bivalvo. Las temperaturas del agua alcanzan sus valores mínimos en invierno y las concentraciones de fitoplancton son entonces muy bajas, debido a la combinación de una turbulencia excesiva y una intensidad luminosa muy baja. En estas circunstancias puede ocurrir que los mejillones mantengan valores bajos de toxicidad (posiblemente por debajo del límite que prohíbe su consumo) durante meses, o incluso que esta toxicidad no llegue a desaparecer nunca por completo antes de ocurrir el nuevo episodio tóxico al verano u otoño siguiente. Este fenómeno se ha podido comprobar en mejillones escandinavos que habían adquirido un elevado nivel de DSP durante el otoño, y no fueron capaces de eliminarla antes de sufrir las gélidas temperaturas de las aguas nórdicas durante el invierno y primavera siguientes.

Factores de susceptibilidad

Características personales: Las personas más susceptibles son aquellas que residen en zonas costeras de países con sistemas de control sanitario poco desarrollados, que carecen de red de vigilancia de episodios de toxicidad en el mar; con bajo nivel de educación sanitaria, y hábito de ingerir moluscos, y más si estos son recogidos directamente de las rocas y no pasan control sanitario. No existen diferencias por edad y sexo.

Distribución temporal: Los episodios tóxicos se presentan generalmente en los meses de verano y otoño, aunque en ocasiones se adelantan ya a finales del invierno comienzos de la primavera.

En Holanda los años 1981, 1986, 1987 y 1989 se produjeron episodios durante los meses de septiembre-octubre, un año también en diciembre. En las rías gallegas el *D. acuminata* está presente

prácticamente todo el año y su proliferación suele comenzar en abril aunque algunos años se adelanta a finales de febrero o marzo, presentando una serie de máximos y mínimos hasta mediados o finales del otoño. El *D. acuta* suele presentarse asociada a vientos de componente sur de septiembre a noviembre debido a la advección de poblaciones ya establecidas en la plataforma costera adyacente, y el *D. caudata* suele encontrarse en forma aislada en el plancton.

Distribución espacial: La intoxicación por DSP tiene una amplia distribución mundial, siendo las costas del oeste de Europa y las del Japón las más afectadas.

FACTORES QUE INFLUENCIAN EL CRECIMIENTO EXPLOSIVO DE LOS DINOFLAGELADOS

Las mareas rojas son un fenómeno natural que consiste en la proliferación masiva de organismos unicelulares presentes en el fitoplancton el cual presenta ciclos naturales de crecimiento y decrecimiento numérico regulados por ciertas condiciones físicas y químicas del agua, tales como la temperatura moderada, el descenso en la salinidad, las aguas tranquilas, la luz (los días largos) y la presencia y concentración de ciertas sustancias orgánicas e inorgánicas (nutrientes), y también, interacciones biológicas. En ocasiones y bajo condiciones ambientales favorables, algunos de estos organismos productores de mareas rojas (los dinoflagelados) se multiplican repentinamente, dando lugar a un crecimiento explosivo, causando notorias coloraciones del agua y cuando son especies tóxicas envenenamiento de los moluscos.

Los dinoflagelados se reproducen por división simple o múltiple, y tras un periodo de intensa actividad reproductora, se enquistan pasando en este estado largas temporadas sobre el fondo marino.

La iniciación y desarrollo de las mareas rojas así como su posterior desaparición, dependen de la interacción de múltiples factores biológicos, bioquímicos, hidrográficos y meteorológicos todavía poco entendidos.

En algunas regiones ocurren con cierta periodicidad, llegando a transformarse en fenómenos anuales, mientras que en otras se presentan sin ninguna regularidad u ocasionalmente.

La aparición de mareas rojas se debe a dos conjuntos de factores, de una parte los que favorecen el incremento de las poblaciones de microalgas y de otra los que favorecen su concentración.

1. Factores que influyen el incremento de las poblaciones de microalgas: En el incremento de las poblaciones de microalgas influyen los siguientes factores:

a) El enriquecimiento del agua en nutrientes debido a la subida de las aguas del fondo, al drenaje de las tierras por la lluvia y a los vertidos de aguas residuales urbanas o industriales.

b) Los cambios en la temperatura del agua que influyen sobre el enquistamiento (descenso de la temperatura) o exquistamiento (ascenso de la temperatura) de los dinoflagelados.

c) La luz solar, que es esencial para los procesos de fotosíntesis condicionantes de la forma vegetativa.

d) La salinidad, cuyo descenso, producido por un aporte de agua dulce en la desembocadura de los ríos o por una elevada pluviosidad, favorece la aparición de mareas rojas.

e) La materia orgánica procedente del drenaje de las tierras, o de la descomposición de plantas marinas, peces y otros organismos muertos.

f) Los metales y quelantes, originando los primeros un descenso del crecimiento y lo contrario los segundos.

g) Las sustancias promotoras del crecimiento (vitamina B₁₂).

h) El mar en calma, favorece el crecimiento y la acumulación de fitoplancton.

2. Factores que influyen en la concentración: Los dinoflagelados se reagrupan por fenómenos de concentración hidrológica, procesos de acumulación en los que influyen el viento moderado, que empuja las aguas superficiales hacia la costa; los fenómenos de convergencia, por

los que los dinoflagelados se concentran a lo largo del frente separador de dos masas de agua de densidades distintas, y los movimientos de convección debidos a los vientos que facilitan la concentración de los dinoflagelados en las líneas de convergencia.

Cuando las condiciones ambientales son desfavorables las células vegetativas haploides de gran cantidad de especies de dinoflagelados forman quistes que pueden resistir condiciones muy adversas y permanecer viables en el sedimento por largos periodos de más de 15 años.

El hecho de que los quistes sean tan resistentes permite que sean transportados en forma viable de una a otra zona en la que se pueda desarrollar la fase móvil, atravesando en el trayecto un medio adverso.

La germinación de los quistes viene condicionada por factores internos y externos o desencadenantes (temperatura, luz y oxigenación).

Los dinoflagelados tienen periodos de maduración y de latencia. Cuando los quistes germinan y emergen las células móviles, su supervivencia depende de su capacidad para salir del sedimento a la columna de agua (lo que es favorecido por las turbulencias, que luego son perjudiciales para el desarrollo de las poblaciones de dinoflagelados que precisan de aguas estables que eviten su dispersión) y la posibilidad de encontrar en dicha columna un ambiente favorable.

La importancia como inóculo de las poblaciones de quistes depende de su abundancia en el sedimento; su capacidad para germinar, y la supervivencia de las células móviles emergidas.

Los moluscos bivalvos filtran el agua y retienen el fitoplancton, que no resulta tóxico para ellos. El mejillón concentra el DSP en la hepatopáncreas, en tanto la almeja lo hace en los sifones. El grado de toxicidad que adquiere el bivalvo va a depender de la toxicidad por célula de los organismos fitoplanctónicos tóxicos.

Las toxinas son metabolitos secundarios producidos por el fitoplancton tóxico cuya función fisiológica y ecológica se desconoce. La cantidad y proporción relativa de toxinas producidas depende de una serie de factores intrínsecos de las células (genotipo, edad, tamaño,

momento del ciclo celular, estado fisiológico general), y de factores ambientales (temperatura, salinidad, pH, luminosidad, nutrientes disponibles, y proporción relativa de los distintos nutrientes entre si. El contenido de toxina por célula es por tanto variable y por ello la dificultad de dar respuesta a la pregunta ¿a partir de cuantas células por litro se puede volver tóxico el mejillón?

PREVENCION

Comprende medidas de Prevención Primaria, que se basan en la vigilancia en el mar y en el mercado para predecir de forma efectiva los fenómenos de toxicidad antes de que ocasionen cuadros de intoxicación humana, y medidas de Prevención Secundaria, a adoptar ante un brote de intoxicación humana. Ambos conjuntos de medidas se basan en la Vigilancia Epidemiológica.

No es posible actuar frente al reservorio impidiendo la proliferación de los dinoflagelados mediante la modificación de los factores que la favorecen. Tampoco podemos hacer nada para evitar la acumulación de toxina en los moluscos, ni siquiera intervenir acelerando su detoxificación. Solo nos cabe actuar sobre el tercer eslabón de la cadena, los sujetos susceptibles informándoles de los riesgos y poniendo todos los medios a nuestro alcance para evitar que consuman los moluscos tóxicos que, como hemos comentado anteriormente, no sufren cambios organolépticos que alerten al consumidor, y los tratamientos culinarios ordinarios tampoco destruyen la toxina.

En los programas de Vigilancia Epidemiológica el disponer de trazadores es fundamental para la prevención. En el caso de la DSP el trazador mas difundido es la visualización de la marea roja, la cual, con todas sus limitaciones, previene brotes de enfermedad, sin embargo su eficiencia es muy limitada pues pueden producirse episodios tóxicos sin previa presentación de marea roja. El sistema de vigilancia más eficiente consiste en la determinación en las aguas marinas de cambios que sugieran que puedan producirse proliferaciones de especies de plancton tóxicas, la vigilancia de la aparición de estas especies así como de la presencia de sus toxinas en los moluscos.

PROGRAMA DE CONTROL DE BIOTOXINAS MARINAS

Dado que hasta el momento no se puede predecir a ciencia cierta la aparición de episodios tóxicos, la prevención se basa en el establecimiento de una red de alerta de mareas rojas y un sistema de vigilancia en las depuradoras y el mercado para determinar la ausencia de DSP o su presencia a niveles inferiores a los establecidos legalmente en los moluscos depurados destinados al consumo humano.

Vigilancia en el mar: Red de alerta de mareas rojas

Los programas de vigilancia en el mar deben tener distintos niveles de intensidad dependientes de la existencia o no de especies de plancton tóxicas o de condiciones favorables para la proliferación de dichas especies. Debe existir una perfecta coordinación y un sistema de comunicación fluido y rápido entre las Administraciones responsables de la vigilancia en el mar (Administración pesquera) y en los mercados (Sanidad, Agricultura, Alimentación) y las autoridades sanitarias.

La Red de alerta de mareas rojas consta de dos subprogramas:

- Estudios del plancton y de las condiciones favorecedoras de su proliferación al objeto de predecir cuando se van a producir proliferaciones marinas tóxicas y detectar lo más precozmente posible su existencia (mareas rojas).
- Programa de vigilancia de los moluscos para comprobar la presencia de toxina tanto en los parques y polígonos de cultivo, con anterioridad a autorizar su extracción, como en las estaciones depuradoras antes de su salida al mercado.

Para lograr una gestión lo más eficaz posible, que ocasione los menores trastornos a los productores y permita garantizar la seguridad del producto a los consumidores, conviene establecer dentro de los parques de cultivo zonas y subzonas, así como puntos fijos primarios, los considerados sobre la base de la experiencia como los de más rápida afectación en caso de surgir algún episodio tóxico, y puntos fijos

secundarios, complementarios de los anteriores, que permiten un conocimiento más detallado del grado de afectación de las zonas.

Para el mejor funcionamiento de un Programa de muestreo, seguimiento y control del fitoplancton tóxico y DSP, deben establecerse planes de actuación en función de las especies de fitoplancton que originan la toxicidad y de los moluscos y áreas afectados. Dichos planes se establecerán previo análisis de la información obtenida por el Programa de control de las condiciones oceanográficas y fitoplanctónicas junto con el de biotoxinas en moluscos. En Galicia, en base a ello están establecidos cuatro planes de actuación.⁵⁹

Plan A (Situación normal). Las condiciones oceanográficas no son favorables para el desarrollo de especies fitoplanctónicas tóxicas, ni estas se encuentran en concentraciones significativas, ni hay toxicidad en los moluscos bivalvos.

Plan B (Situación de alerta), dividido a su vez en tres subplanes:

B1: Cuando a pesar de existir condiciones oceanográficas favorables no se observan especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas en concentraciones significativas, ni hay toxicidad en los moluscos bivalvos.

B2: Hay condiciones oceanográficas favorables y presencia de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas, pero no hay toxicidad en los moluscos bivalvos.

B3: Hay condiciones oceanográficas favorables, incremento significativo de la población tóxica y se detecta toxicidad en los moluscos bivalvos, pero en niveles inferiores a los límites legalmente establecidos.

Plan C (Prohibición de extracción). Se establece cuando los niveles de toxicidad son superiores a los límites legalmente establecidos. A su vez se divide en tres subplanes:

C1: Las condiciones oceanográficas son favorables y hay un incremento significativo de la población tóxica y de los niveles de toxicidad en los moluscos bivalvos.

C2: Las condiciones oceanográficas son desfavorables para el desarrollo de especies de plancton tóxicas y hay estabilización o descenso de la población tóxica, así como de los niveles de toxicidad en los moluscos bivalvos.

C3: Las condiciones oceanográficas son desfavorables, hay un descenso significativo y/o desaparición de la población tóxica y los niveles de toxicidad están próximos a los límites legales.

Plan D: Las condiciones oceanográficas son desfavorables para el desarrollo de las especies de plancton tóxicas, hay ausencia o concentraciones no significativas de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas, y se mantiene una toxicidad inferior a los límites legales como consecuencia de un episodio tóxico anterior.

Toma de muestras de moluscos

Las muestras de moluscos bivalvos en las bateas deben tomarse a distintas profundidades (1, 5 y 10 metros), dado que la toxicidad puede variar con la profundidad. Su análisis será separado o integrado dependiendo del grado de uniformidad del mejillón y de las condiciones oceanográficas y acumulación o no de toxicidad a una profundidad determinada. En los bancos naturales y parques de cultivo las muestras se procurará que sean lo más significativas posible, en función de la especie objeto de control y de las características de la zona.

La frecuencia del muestreo varía en cada plan de actuación:

Plan A (durante todo el año): Muestreo semanal de las condiciones oceanográficas y del fitoplancton, así como de biotoxinas en mejillón en los puntos fijos primarios, y quincenales en el mejillón de roca.

Plan B (situación de alerta):

B1: Muestreo selectivo de fitoplancton.

B2: Incremento a dos veces por semana del muestreo para biotoxinas en mejillón en los puntos fijos primarios.

B3: Incremento del muestreo a tres veces por semana y cuando los resultados de los bioensayos así lo aconsejen se iniciará el muestreo en otras especies y en los puntos fijos secundarios susceptibles de ser más afectados.

Plan C: Prohibida la extracción.

C1: Las especies y frecuencia del muestreo vendrán determinadas por la intensidad del episodio tóxico y las previsiones existentes. Las subzonas limítrofes (comprendidas dentro de una misma zona) a una subzona cerrada que se encuentren abiertas se muestrearán diariamente.

C2: Toma de muestras en los puntos fijos primarios o secundarios para evaluar el grado de afectación de la zona o subzona.

C3: Toma de muestras para biotoxinas como mínimo tres veces por semana.

Plan D: Se levanta la prohibición de extracción. En los puntos fijos donde la toxicidad, aunque inferior a los límites legales, se mantenga más alta, se tomarán muestras dos veces por semana.

Vigilancia en el mercado

Se realizarán controles rutinarios a lo largo de todo el año por medio de los inspectores veterinarios responsables del control de las condiciones de salubridad e higiene de los alimentos, intensificándolos en las épocas en las que existan o acostumbren a presentarse estos problemas.

Vigilancia de la enfermedad

La vigilancia de la enfermedad puede tener especial importancia como método alternativo de prevención “primaria”, en países incapaces de hacer frente a los costos de un programa de vigilancia continuo o incluso puntual, de los parques de cultivo de moluscos.

En estas circunstancias la detección de los primeros casos de enfermedad sirve para adoptar medidas preventivas que eviten la aparición de más casos. En cualquier caso se requiere disponer de una

mínima infraestructura de Salud Pública tal como personal con formación adecuada y laboratorios con personal entrenado y con las técnicas estandarizadas.

La educación del personal médico y de salud pública en lo concerniente al diagnóstico, tratamiento (sintomático) y notificación de los casos sospechosos es muy importante para el éxito del programa de vigilancia.

La educación de las poblaciones en riesgo sobre las medidas preventivas tales como no consumir moluscos cuando existan mareas rojas tóxicas y no consumir nunca mejillones cogidos en las rocas ni moluscos recogidos directamente en la playa es fundamental, y nunca se insistirá lo bastante en ello. La población debe ser puntual y continuamente informada, a través de los medios de comunicación más adecuados, de la existencia de mareas rojas tóxicas, su evolución y desaparición.

Finalmente la educación y cooperación de la industria en todo lo relacionado con los riesgos de las intoxicaciones por toxinas marinas así como sobre los programas de prevención primaria y secundaria, es necesaria para que estos programas funcionen de modo efectivo.

Normativa Europea

En Europa las Directivas Comunitarias 91/492⁶⁰ y 91/493⁶¹ de 15 y 22 de julio de 1991, fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y la puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos y de los productos pesqueros respectivamente, y establecen los requisitos en materia de biotoxinas marinas, disponiendo con relación a las toxinas DSP lo siguiente: *Los métodos habituales de análisis biológico no deben dar reacción positiva respecto de la presencia de DSP, en las partes comestibles de los moluscos (cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado).*

Si bien en lo que concierne a las toxinas PSP existe un acuerdo generalizado en cuanto al método analítico a emplear, esto es, el bioensayo en ratón de la AOAC, y respecto al límite de tolerancia, 80 µg equiv. STX/100 g de vianda, en el caso de las toxinas DSP no existe

consenso internacional ni en el criterio de toxicidad ni en el procedimiento analítico más adecuado para su control.

La Directiva es vaga, ya que no establece el método de detección de las toxinas DSP, indicando tan solo que debe ser biológico y, por otra parte, tampoco establece los límites de tolerancia, que dependerán en cada caso del límite de detección del método biológico utilizado. En consecuencia, existen importantes diferencias en los métodos de análisis y en los criterios de toxicidad actualmente aplicados en diferentes países de la Unión Europea para el control sanitario de las biotoxinas marinas.

Al objeto de eliminar estas discrepancias entre los Estados miembros y armonizar el mercado europeo, la Comisión Europea nombró un Laboratorio Nacional de Referencia en cada país miembro (LNRS) y un único Laboratorio Comunitario de Referencia (LCR), con el fin de organizar y coordinar una red de intercambio de información, conocimientos y experiencias y crear un foro de acuerdos metodológicos y toxicológicos, siendo el Laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo, perteneciente al Ministerio de Sanidad y Consumo, nominado como Laboratorio Comunitario de Referencia.⁶²

Los niveles de tolerancia se han establecido sobre la base de los escasos estudios toxicológicos y epidemiológicos realizados, y los límites de detección de los métodos analíticos disponibles y, en muchas ocasiones, basándose simplemente en las regulaciones de otros países.

Los pocos estudios de toxicidad aguda llevados a cabo en ratas y ratones indican que el AO afecta a la integridad de la mucosa intestinal y que el principal síntoma de intoxicación es la diarrea. La dosis letal de AO en ratones, por vía intraperitoneal, es de 200 µg/kg. de peso, y la de DTX-1 de 160 µg/kg de peso.

La dosis mínima requerida para que se produzcan síntomas tóxicos en humanos fue inicialmente fijada por Yasumoto en 10-12 UR de DSP, lo que equivale a 40-48 µg de AO, produciendo síntomas severos 76-80 µg de AO. Más adelante, al ir conociéndose mejor las toxinas DSP, Hamano et al.⁶³ en 1985, señalaron que las dosis mínimas

de AO y DTX-1 que producen diarrea en adultos son 40 y 36 μg respectivamente.

El primer país que estableció un nivel de tolerancia fue Japón, que asumió 5 UR/100 g de vianda o, lo que es lo mismo, 20 μg de AO/100 g de vianda, como la máxima cantidad de toxina permitida en los moluscos, lo que equivaldría en el caso de asumir que el hepatopáncreas (hp) es un 10% del total del cuerpo a 0,5 UR¹⁹ (2 μg de AO/g de hp).

El nivel de tolerancia no debe establecerse únicamente sobre la base de los cuadros agudos de diarrea producidos por DSP, puesto que de la bibliografía existente se deduce que existe la posibilidad de otros efectos más graves tales como la promoción del crecimiento tumoral, efectos hepatotóxicos y cardiotóxicos).

INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE UN BROTE DE INTOXICACIÓN POR DSP

Los brotes de intoxicación humana por toxina diarreica se caracterizan por ser explosivos, localizados y de corta duración, brotes holomiánticos, dado el muy corto período de incubación que oscila entre treinta minutos y algunas horas, que depende de la cantidad de toxina ingerida (carga tóxica del molusco y cantidad de moluscos ingerida) y la exposición a una fuente común.

La investigación suele comenzar a partir de la comunicación del caso índice a las autoridades sanitarias. Dicha declaración, que en muchos países es obligatoria cuando se trata de un brote, debe realizarse ante la sospecha clínica, pero dado que esta es subjetiva, lo primero que habrá que realizar es la confirmación diagnóstica del caso.

La sospecha diagnóstica es más fácil realizarla cuando existe marea roja tóxica y si los médicos y la población están alertados. Los casos aislados de intoxicación por DSP, si no se piensa en ella, pasaran fácilmente inadvertidos dada la inespecificidad de su clínica (diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal), y a su benignidad. Más fácil resulta la identificación etiológica en los cluster (episodios en los que dos o más casos de la misma enfermedad tienen relación entre sí).

En la investigación de un brote de DSP podemos distinguir tres fases:

1. Establecimiento o verificación del diagnóstico de los casos registrados y confirmación de la existencia del brote
2. Identificación de la fuente de la intoxicación y modo de transmisión, otras personas que hayan podido estar o que estén expuestas, así como de los casos que pudieran haberse producido con anterioridad.
3. Descripción de los casos de acuerdo con las variables de persona, lugar y tiempo

Notificación urgente a las autoridades sanitarias ya de la simple sospecha, al objeto de que estas adopten las pertinentes medidas preventivas de tipo administrativo.

Confirmación del brote

En primer lugar se determinará si la clínica (gastroenteritis sin fiebre) y su evolución (benigna con recuperación total en tres días) se corresponden con la de una intoxicación por DSP; si el periodo de incubación es corto (treinta minutos a unas pocas horas); si existe antecedente de ingesta de moluscos y su procedencia para establecer la exposición ambiental, y existencia de una marea roja tóxica. Seguidamente debe realizarse la confirmación diagnóstica por el laboratorio.

Hay que excluir otra posible etiología como toxiiinfección por *Bacillus cereus* o por *Vibrio parahaemolítico*, este último también vehiculado por moluscos, y en las que tampoco suele haber fiebre, pero el periodo de incubación es más largo (12 horas) y el germen puede identificarse en las heces o en restos de alimentos.

Un cuadro clínico de gastroenteritis sin fiebre con antecedente de ingesta de mejillones y un corto período de incubación, debe hacernos pensar en una intoxicación por DSP, más si en ese momento existe marea roja tóxica de tipo DSP. A partir del estudio de los brotes japoneses la OMS (1984) estableció la siguiente frecuencia de síntomas: diarrea

(92%), náuseas (80%), vómitos (79%), dolor abdominal (53%) y escalofríos (10%).

Para su confirmación por el laboratorio precisamos disponer de restos de alimentos (mejillones no consumidos) o tomar una muestra de mejillones de la misma zona de procedencia de los consumidos (centro comercial, depuradora de moluscos, parque de cultivo, roca, etc.).

La técnica habitualmente utilizada es el bioensayo en el ratón desarrollado por Yasumoto sin modificaciones (Bélgica, Dinamarca y España) o con modificaciones para eliminar las interferencias por PSP (Italia y Reino Unido), que a su vez puede arrastrar en el lavado las yessotoxinas presentes en las muestras, o con modificaciones para eliminar las posibles interferencias de ácidos grasos que también conllevan el riesgo de arrastrar en los lavados las toxinas del grupo DSP débilmente polares como son los acilderivados (Francia y Portugal).

Los criterios de positividad varían de muerte de dos de tres ratones antes de las 24 horas en Bélgica, Dinamarca y España (12 horas en Galicia), a menos de 5 horas en Italia, Reino Unido, Francia y Portugal.

Algunos países como Irlanda, Holanda y Alemania utilizan el bioensayo en ratas desarrollado por M. Kat.⁶⁴

El bioensayo en el ratón es generalmente el más utilizado debido a que es más sensible (4 µgr de OA) que el de exposición por ingestión oral en ratas (10 µgr de OA), pero el bioensayo en el ratón está sujeto a resultados falso positivos por interferencias de componentes no-ficotóxicos, y es más caro ya que supone que mueran los ratones o que deban ser descartados, en tanto las ratas se pueden utilizar repetidas veces, pero la interpretación en estas del test depende del examen subjetivo de las heces.

Existen también métodos químicos como la Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) el más utilizado después de los bioensayos; las pruebas de inhibición enzimática como los test de inhibición de la proteína fosfatasa;⁶⁵ (ensayos fluorimétricos, colorimétricos y de luminiscencia), técnica novedosa, barata y prometedora;⁶⁶ el

inmunoensayo, (anticuerpos monoclonales frente al ácido okadaico y DTX-1 y ELISA), hay varios kits comerciales disponibles, el test de citotoxicidad (puesta en evidencia de cambios morfológicos causados por la actividad de la toxina DSP en distintas líneas celulares: células KB humanas, hepatocitos de salmón y rata, cultivo de neuronas, etc.).

Estas técnicas, fundamentalmente los bioensayos, la HPLC y la inhibición de las fosfatasas son las que se utilizan habitualmente para la vigilancia sanitaria. Consideraciones éticas y técnicas están haciendo hincapié en el desarrollo y uso de pruebas para el control sanitario que no supongan la utilización de animales.

Identificación de la fuente, mecanismo de transmisión y sujetos susceptibles

Es fundamental conocer el tipo de moluscos responsable y su origen, si fueron adquiridos en el mercado o recogidos directamente en parques de cultivo o en rocas, y si existen todavía restos sin consumir. También interesa saber si fueron consumidos en el domicilio o en algún establecimiento comercial.

También es preciso saber que otras personas los hayan podido consumir, búsqueda de otros casos, o puedan tener moluscos de la misma procedencia, para destruirlos y evitar su consumo. Asimismo se investigará la existencia de casos anteriores en la zona y áreas limítrofes.

Descripción de los casos de acuerdo con las variables de persona, lugar y tiempo

Con relación a la variable persona recogeremos información sobre la edad, sexo y ocupación; respecto a la variable lugar interesa conocer la distribución geográfica de los casos por lo que recogeremos información sobre el domicilio, y con respecto al tiempo nos interesa recoger información sobre el día y hora de la exposición (ingesta de los moluscos) así como del inicio de los primeros síntomas, su secuencia de aparición. También es interesante recoger información sobre la cantidad de moluscos ingerida que nos puede dar una primera idea sobre su carga tóxica.

Medidas administrativas de control

Ante la aparición de un brote se establecerán medidas administrativas de control sobre la fuente prohibiendo la extracción de los moluscos y poniendo en marcha un sistema de monitorización de la zona, y vigilancia continuada de la enfermedad alertando a los médicos sobre su existencia para que extremen las sospechas diagnósticas ante procesos de tipo gastroenterítico. Al mismo tiempo se realizará educación de la población: industriales, profesionales sanitarios y población en general a través de los medios de comunicación de masas, alertándoles sobre los peligros y advirtiéndoles que no deben consumir los moluscos afectados.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Exodo 7: 14-25
- (2) KAO CY. (1966) Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev* 18:997-1049.
- (3) HALSTEAD BN.(1965) Poisonous and venomous marine animals of the world. Vol I. Invertebrates. Washington: Government Printing Office.
- (4) CHEVALIER A, DUCHESNE EA.(1851) Memoire sur les empoisonnements par les huîtres, les moules, les crabes, et par certains poissons de mer et de riviere. *Ann Hyg Publ* (Paris) 45(1): 108-147.
- (5) CHEVALIER A, DUCHESNE EA. (1851) Memoire sur les empoisonnements par les huîtres, les moules, les crabes, et par certains poissons de mer et de riviere. *Ann Hyg Publ* (Paris) 45(2): 387-437.
- (6) VANCOUVER G. A (1801) Voyage of discovery to the North Pacific Ocean and round the world. London: John Stockdale 4:44-47.
- (7) MEYER KE, SOMMER KF, SCHOENHOLZ P. (1928) Mussel poisoning. *J Prev Med* 2:365-394.
- (8) SOMMER KF, MEYER KE.(1937) Paralytic shellfish poisoning. *Arch Pathol* 24 (5): 560-598.
- (9) KORRINGA P, ROSKAM RT. (1961) An unusual case of mussel poisoning. International Council of the Exploration of the Sea (ICES). Council Meeting 49.
- (10) ROSSEBE L, THORSON B, ASSE R.(1970) Etiologisk uklar matforgifning etter konsum av blaskjell. *Norsk Vet Tidsskr* 82: 639-642.
- (11) KAT M. (1979) The occurrence of *Prorocentrum species* and coincidental gastrointestinal illness of mussels consumers. In: D Taylor and HH Seliger, eds. Toxic Dinoflagellate Blooms. Amsterdam: Elsevier, pp 215-220.
- (12) YASUMOTO T, OSHIMA Y, YAMAGUCHI M. (1979) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Japan and chemical properties of the toxin. In: D Taylor, HH Seliger, eds. Toxic Dinoflagellate Blooms. Amsterdam: Elsevier, pp 495-502.
- (13) GESTAL OTERO JJ, HERNÁNDEZ COCHÓN JM, BAO FERNÁNDEZ O, MARTÍNEZ-RISCO LÓPEZ L.(1978) Brote de Mitilotoxismo en la Provincia de La Coruña. *Bol Inst Espa Oceano* IV (258): 5-29.
- (14) YASUMOTO T, OSHIMA Y, YAMAGUCHI M.(1978) Occurrence of a new type shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44: 1249-1255.

- (15) YASUMOTO T, OSHIMA Y, SUGAWARA W, FUKUYO Y, OGURI H, IGARISHI T, FUJITA N.(1980) Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 46: 1405-1411.
- (16) SUGANUMA M, FUJIKI H, SUGURI H, YOSHIKAWA S, HIROTA M, NAKAYASU M, OKIKA M, WAKAMATSU K, YAMADA K, SUGIMURA T. (1988) Okadaic acid: an additional non phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type promoter tumoral. *Proc Nat Acad Sciences USA* 85(6): 1768-1771
- (17) FUJIKI H, SUGANUMA M, SUGURI H, YOSHIKAWA S, TAKAGI K, SASSA T, UDA N, WAKAMATSU K, YAMADA K, YASUMOTO T, KATO Y, FUSEYANI N, HASHIMOTO K, SUGIMURA T. (1988) Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn J Cancer Res* 79:1089-1093.
- (18) AONUMA S, T USHJIMA T, NAKAYASU M, SHIMA H, SUGIMURA T, NAGAO M. (1991) Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor in CHL cells, but not in *S. Typhimurium*. *Mutat Res* 250: 375-381.
- (19) HOKAMA Y, SCHEUER PJ, YASUMOTO T. (1989) Effect of marine toxin on human peripheral blood monocytes. *J Clin Lab Anal* 3: 215-221.
- (20) SUNDSTROM B, EDLER L, GRANÉLI E. (1990) The global distribution of harmful effects of phytoplankton. En: E Granéli, B Sundstrom, L Edler and DM Anderson, eds. *Toxic Marine Phytoplankton*. Amsterdam: Elsevier, pp 537-541.
- (21) VAN EGMOND HP, AUNE T, LASSUS P, SPEIJERS GJA, WALDOCK M.(1993) Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J Nat Toxins* 2 (1): 41-79, 1993.
- (22) HALD B, BJERGSKOV T, EMSHOLM H. (1991) Monitoring and analytical programmes on phycotoxins in Denmark. In: JM Fremy, ed. *Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins*. Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires de France, pp 181-187.
- (23) DAHL E, YNDESTAD M. (1985) Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis spp.* En: DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, pp 495-500.
- (24) KROGH P, EDLER L, GRANÉLI E. (1985) Outbreaks of diarrhetic shellfish poisoning on the west coast of Sweden. En: DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, pp 501-504.
- (25) CAMPOS MJ, FRAGA S, MARIÑO J, SÁNCHEZ FJ.(1982) Red tide monitoring program in NW Spain. Report of 1977-1981. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Council Meeting L: 27.

- (26) KAWABATA T.(1989) Regulatory aspectos of marine biotoxins in Japan. In: S Natori, K Hashimoto and Y Ueno, eds. *Micotoxins and Phycotoxins'88*. Amsterdam: Elsevier, pp 469-476.
- (27) KONOVALOVA GV.(1993) Toxic and potentially toxic dinoflagellates from the far east coastal waters of the USSR. In: TJ Smayda and Y Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Newport (USA) 1991. Amsterdam: Elsevier, pp 275-279.
- (28) KARUNASAGAR I, SEGAR K, KARUNASAGAR I.(1989) Incidence of PSP and DSP in shellfish along the coast of Kamataka state (India). En: T Okachi, DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Amsterdam: Elsevier, pp 61-64.
- (29) QUILLIAM MA, GILGAN MW, PLEASANCE S, DEFREITAS ASW, DOUGLAS D, FRITZ L, HU T, MARR JC, SMYTH C, WRIGHT JLC (1993). Confirmation of an incident of diarrhetic shellfish poisoning in Earstern Canada. En: TJ Smayda and Y Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Newport (USA), 1991. Amsterdam: Elsevier, pp 547-552.
- (30) GILGAN MW, POWELL C, VAN DE RIET J, BURNS BG, QUILLIAM MA, KENNEDY K, MCKENZIE CH. (1995) The ocurrence of a serious diarrhetic shellfish poisoning episode in mussels from Newfoundland during the late autumn of 1993. *Four Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*. Sidney BC, pp 3-5.
- (31) FREUDENTHAL AR, JACOBS J. (1995) Observations on *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis norvergica* in Long Island waters: Toxicity, ocurrence following diatomdiscolored water and co-ocurrence with *Ceratium*. En: TJ Smayda and Y Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Newport (USA). Amsterdam: Elsevier (abstract) .
- (32) LEMBEYE G, YASUMOTO T, ZHAO J, FERNÁNDEZ R.(1993) DSP outbreak in Chilean fjords. En: TJ Smayda and Y Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Newport (USA), 1991. Amsterdam: Elsevier, pp 525-529.
- (33) MÉNDEZ S. (1992) Update from Uruguay. *Harmful Algae News*. An Intergovernmental Oceanographic Commision (IOC). Newsletter on toxic algae and algal blooms 63: 5.
- (34) OGINO H, KUMAGAI M, YASUMOTO T.(1997) Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 5: 255-259.

- (35) SATAKE M, MACKENZIE L, YASUMOTO T. (1997) Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins* 5: 164-167.
- (36) TUBAZO A, SIDARI L, LOGIA LD, YASUMOTO T.(1998) Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. En B Reguera, J Blanco, ML Fernández, T Wyatt (eds): Harmful Algae. Paris: IOC/UNESCO; 470-472.
- (37) MURATA M, SHIMATANI M, SUGITANI H, OSHIMA Y, YASUMOTO T. (1982) Isolation and structure elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 43; 549-552.
- (38) LEE JS, IGARASHI T, FRAGA S, DAHL E, BOGAD P, YASUMOTO T.(1989) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J Appl Phycol* 1: 147-152.
- (39) MURAKAMI Y, OSHIMA Y, YASUMOTO T. (1982) Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 48: 69-72.
- (40) TACHIBANA K, SCHEUER PJ; TSUKITANI Y, KIKUCHI H, VAN ENGEN D, CLARDY J, GOPICHAND Y, SCHMITZ FJ.(1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*, *J Am Chem Soc* 103: 2469-2471.
- (41) YASUMOTO T, MURATA M, OSHIMA Y, SANO M, MATSUMOTO GK, CLARDY J.(1985) Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41:1019-1025.
- (42) HU T, DEFREITAS ASW, DOYLE J, JACKSON D, MARR J, NIXON E, PLEASANCE S, QUILLIAM MA, WALTERJA, WRIGHT JLC.(1992) Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Chem Commun* 30:39-41.
- (43) MURATA M, SANO M, IWASHITA T, NAOKI H, YASUMOTO T. (1986) The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric Biol Chem* 50:2693.
- (44) MURATA M, KUMAGAI M, LEE JS, YASUMOTO T. (1987) Isolation a structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 28:5869-5872.
- (45) BIALOJAN C, TAKAI A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256: 283-290.
- (46) HAMANO Y, HINOSHITA Y, YASUMOTO T.(1986) Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *J Food Hyg Soc Jpn* 27: 375-379.
- (47) TERAO K, ITO E, YANAGI T, YASUMOTO T. (1986) Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small

- intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. *Toxicon* 24: 1141-1151.
- (48) COHEN P, COLMES CFB, TSUKITANI Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15: 98-102
- (49) CARMODY EP, JAMES K, KELLT S, THOMAS K.(1995) Complex diarrhetic shellfish toxin profiles in Irish Mussels. En: P Lassus, G Arzul, LE Erard, E Denn, P Gentien and C Marcaillou Lebaut, eds. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier Science Pub.; 273-278.
- (50) BLANCO J, FERNÁNDEZ ML, MARIÑO J, REGUERA B, MIGUEZ A, MANEIRO J, CACHO E, MARTÍNEZ A.(1995) From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks. A preliminary model of toxin accumulation in mussels. En: P Lassus, G Arzul, LE Erard, E Denn, P Gentien and C Marcaillou Lebaut, eds. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier Science Pub.; 777-782.
- (51) KAT M. (1985) *Dinophysis acuminata* blooms, the distinct cause Dutch mussel poisoning. En: DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, pp 73-77.
- (52) BAUT C LE, LUCAS D, DEAN L (1985) Le. *Dinophysis acuminata* toxin status of toxicity bioassays in French. En: DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, 485-488.
- (53) SAMPAYO MA, ALVITO P, FRANCA S, SOUSA I. (1990) *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. En: E Granéli, B Sundstrom, L Edler and DM Anderson, eds. *Toxic Marine Phytoplankton*. Amsterdam: Elsevier, pp 215-220.
- (54) TUBAZO A, SOSA S, BUSSANI D, SIDARI L, HONSELL G, LUGGIA R (1995) della. Diarrhoeic toxicity induction in mussels of the Gulf of Trieste. En: P Lassus, G Arzul, LE Erard, E Denn, P Gentien P and C Marcaillou Lebaut, eds. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier Pub, 249-254.
- (55) UNDERDAL B, YNDESTAD M, AUNE T.(1985) DSP intoxications in Norway and Sweden, Autumn 1984-Spring 1985. En DM Anderson AW White and DG Baden, eds. *Toxic Dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier, pp 489-494.
- (56) VIEITES JM, LEIRA SANMARTÍN FJ. (1995) Resultados preliminares del estudio del proceso de cocción como vía de reducción de la toxicidad DSP en moluscos bivalvos. *Alimentaria* (octubre) 35-38.
- (57) MEDCORF JC, LEIM AH, NEEDLER AB, NEEDLER AWH.(1947) Paralytic Shellfish poisoning on the Canadian Atlantic coast. *Bull Fish Res Bd Can* LXXV, 32.

- (58) HALSTEAD BW, SCHANTZ EJ (1984). Intoxication paralítica por moluscos. Geneva: WHO. Publ en offset nº 79, 59 pp.
- (59) Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura. Orden de 14 de noviembre de 1995 por la que se regula el programa de actuaciones para el control de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura. Diario Oficial de Galicia nº 221, de 17 de noviembre, pp.: 8454-8467.
- (60) Directiva 91/492/CEE, del Consejo de las Comunidades Europeas de 15 de julio de 1991, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 24-09-91, nº L 268: 1-24.
- (61) Directiva del Consejo 91/493. Pescado. Control veterinario. Fija las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Diario Oficial de las Comunidades Europeas del 22-07-91, nº L 268: 3849-3864.
- (62) Decisión 93/383/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas de 14 de junio de 1993 relativa a los laboratorios de referencia para el control de biotoxinas marinas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 8-7-93, nº L 166: 31-33.
- (63) HAMANO Y, KINOSHITA Y, YASUMOTO T.(1985) Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins. En: DM Anderson, AW White and DG Baden, eds. Toxic Dinoflagelates. Amsterdam: Elsevier, pp 383-388.
- (64) KAT M.(1983) Diarrhoetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagelle *Dinophysis acuminata*. Antonie van Leeuwenhoek 49: 417-427.
- (65) Patente P9501137 registrada en 1995 por ANFACO-CECOPECA, que en 1996 se extendió a la Comunidad Europea, EEUU, Japón y Canada con el registro PCY/ES96/00117: "Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP Diarrhoetic shellfish poison) basado en la inhibición de fosfatasas".
- (66) BOTANA LM, RODRÍGUEZ M, VIEITES JM, LEIRA FJ.(1996) Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP), basado en la inhibición de fosfatasas. Productos del mar VIII (99-100): 26-27.

La Química Agrícola de Liebig: una forma de integración de conocimientos

SEGUNDO JIMÉNEZ GÓMEZ

Académico de Número de la Real Academia de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

Cuando esta Real Academia me hizo el honroso encargo de participar en la conmemoración del segundo centenario del fallecimiento de Lavoisier, inicié mi intervención partiendo de la idea, oída hacía años a Vian y que él mismo ya no recordaba, de que el flujo pulsante de los grandes progresos del conocimiento, se explicaban al coincidir en el tiempo una élite de científicos cuyas aportaciones se potenciaban recíprocamente.

En la Edad Moderna, los primeros indicios de tan fecundo fenómeno aparecen en el siglo XVII y se ratifican en el XVIII, en el que las ideas de Descartes orientan el pensamiento y la experimentación en las Ciencias Naturales hacia la búsqueda de la evidencia, tras el análisis coherente de los hechos reiteradamente repetidos de los que cabría deducir las regulaciones cuantificadas de la Materia y, posteriormente, de la Naturaleza. El siglo XIX, que ocupa la vida de Liebig, es el final de la llamada “época clásica” del desarrollo científico y de la consolidación de la Química como Ciencia, en la que la experimentación es el punto de referencia para descubrir correlaciones lógicas y formular las leyes que las rigen.

Y todo ello tiene lugar desde la fuerza determinadas ideas que, incluso, pueden después ser rechazadas tras de su minucioso análisis crítico. Tal es el caso de la tan conocida piedra filosofal, sobre la que el propio Liebig dice que “La imaginación más viva no es capaz de idear un pensamiento que actúe más poderosamente sobre las facultades humanas que la propia idea de la piedra filosofal. Sin ella la Química no habría alcanzado su perfección actual....” aunque “para llegar a saber que no existía fue

indispensable que todas las sustancias accesibles.....se examinasen y observasen.” Es decir, sigue Liebig, que “la fuerza de la opinión no pudo ser aniquilada hasta que la ciencia no hubo alcanzado un determinado nivel de desarrollo”.

En estas frases reconoce Liebig dos cosas: el valor de la imaginación en el quehacer científico y la necesidad de validar con garantía los resultados; ambos indispensables en la búsqueda del conocimiento. Pero con ellas viene a confirmar también el difundido criterio de que el cúmulo de conocimientos aportados a lo largo del siglo a la Química Mineral, es decir, Inorgánica, parecían haber hecho de ésta una Ciencia terminada, con lo que se estaban poniendo fronteras al campo. Sin embargo, Liebig era consciente de las limitaciones de la alquimia, al decir de ella que “era sólo la débil aurora de una idea”.

En otro momento, ya bien afianzada la Química como Ciencia, Liebig llega a decir que si “¿no es acaso esta Ciencia (la Química) la propia piedra filosofal capaz de transformar los ingredientes de la corteza terrestre en productos útiles que a su vez el comercio convierte en oro? ¿Es que el conocimiento no es acaso la piedra filosofal que nos ofrece descubrir las leyes de la vida y que, felizmente, nos entrega los medios de prolongarla y de curar las enfermedades? “.

La idea de ciencia acabada perduró mucho tiempo, pues Berthelot (1827-1907), ya bien avanzado el siglo, se atrevía a decir que “nada queda por descubrir en Química”. Yo me pregunto ¿cuál sería hoy su asombro, y el de sus contemporáneos, ante la magnitud de los conocimientos de la Química inorgánica, ante los materiales avanzados y los productos obtenidos bajo presión, los super-conductores y semi conductores, los derivados de tierras raras, los organometálicos, los múltiples tipos de catalizadores y tantos otros que harían interminable esta enumeración? .

Posiblemente, este criterio fue determinante para la expansión de la Química Orgánica, que encontró en Liebig uno de sus principales fundadores. Sin embargo, la Química Agrícola, se inicia en buena parte en el ámbito de la

Química Inorgánica, aunque enseguida alcanzó al de la Orgánica, al estudiarse la influencia de la naturaleza y de la estructura del suelo sobre la producción vegetal.

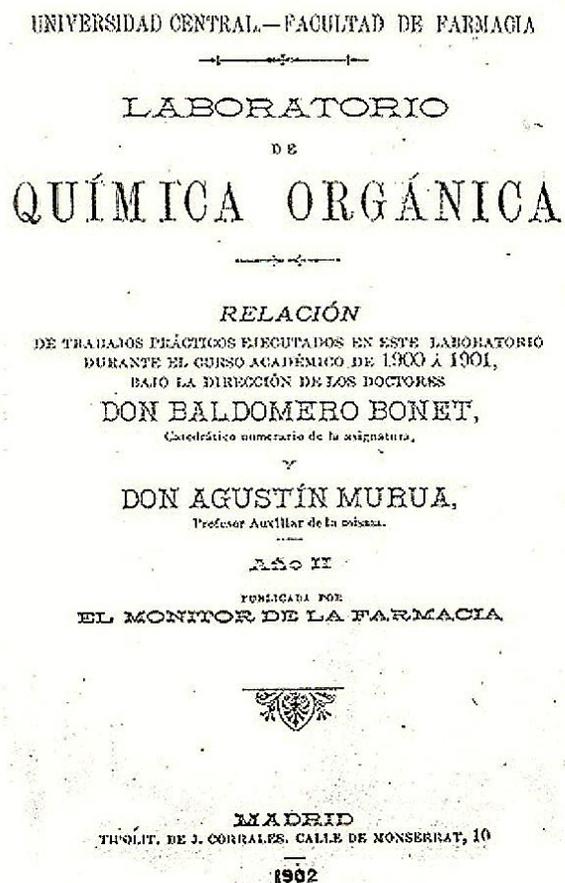


FIGURA 6

Las aportaciones de Liebig se producen en ambos campos. En el Inorgánico, destaca claramente la industria de fertilizantes, aunque pueden citarse otras muchas como el tratamiento especular del vidrio. En el dominio de la Química orgánica deben de figurar, al menos, la oxidación del etanol a ácido acético, la síntesis de ácido tartárico, algunas consideraciones sobre la isomería, etc,

Asimismo, intuyó la existencia de un mecanismo para los procesos de fermentación, de forma que existía una correlación entre el sustrato fermentable y las sustancias que actúan como agentes del proceso, es decir, los fermentos. Sin embargo, hubo de esperar a que Pasteur lo demostrara con claridad, en 1857.

Una nómina importante de cualificados científicos contribuyó a esa potenciación sinérgica a que antes aludía. Entre ellos Jean Batiste André Dumas (1800-18849), que se dedicó a métodos analíticos y a sustituciones en compuestos orgánicos, y aunque compartió con Liebig ideas sobre nutrición vegetal, no dejó de mantener con él controversias, y hasta discrepancias, en relación con la equivalencia química. Contemporáneos de Liebig y cultivadores de la Química Orgánica fueron, igualmente, Woehler (1800-1882), buen amigo y colaborador de suyo, Leopold Gmelin (1788-1853), Stanislaw Cannizaro (1826-1910) y, lógicamente, su discípulo Friedrich August Kekulé, quien antes que Químico fue Arquitecto lo que puede explicar su dedicación a las estructuras de las moléculas químicas. Y hay algunos más que ya se irán citando a lo largo de esta exposición.

Al preocuparse con intensidad por el conocimiento de la materia, se dedicó también a la Fisiología, porque era de esa Ciencia de donde se podían extraer los datos que permiten interpretar los hechos que caracterizan la vida de las especies. De aquí, que pusiera un notorio empeño en buscar las reacciones químicas que tienen lugar en los organismos vegetales y animales, y que la Química Fisiológica le facilitara el estudio de algunos procesos en las plantas y en los animales hasta concluir que la energía vital se origina en combustiones intracelulares.

En alimentación animal esto tiene su lógica dada la naturaleza de las ingestas, pero no así en la vegetal donde, con independencia de los nutrientes captados del suelo, las mayores cantidades nutrientes proceden del aire. Es decir, busca con empeño el eslabón que integre los comportamientos de la materia animada e y de la inanimada, y para ello trabajó Liebig con el apoyo de la Química Fisiológica.

2. LIEBIG Y LA QUÍMICA AGRÍCOLA

El siglo XIX trajo a Europa una gran preocupación por la disponibilidad de alimentos. La base del problema se encontraba en la aparición de un parásito que destruía las cosechas de patatas, con la consecuencia de un mayor consumo de cereales y su progresivo encarecimiento. Además, y como factor añadido, la producción de cereales disminuyó al dedicarse una parte no desdeñable de la tradicional superficie cerealista a producir raíces de invierno y especies herbáceas (trébol y alfalfa), para potenciar la producción ganadera. Al mismo tiempo se introducía la rotación de cultivos para mejorar la fertilidad de los suelos.

Ante el gran interés por aumentar la producción de cereales, se intensificó la recurrencia a viejas prácticas, más o menos empíricas, como el encalado de suelos y el aporte de guano, ambas conocidas desde épocas remotas sin que se supiese con exactitud sus causas. El encalado, es una forma de corregir la acidez de suelos, y el guano es la deyección de determinadas aves de algunas islas del Pacífico y de las costas del sudoeste de África, que se encuentra formando bancos que tienen hasta 20 metros de espesor. Se suponía que aportaba nitrógeno dados los buenos resultados que se conseguían con su uso, lo que dio origen, hacia 1840, a que se mantuviera un considerable comercio de este producto con las costas del Pacífico. Hoy, efectivamente, se sabe que aporta nitrógeno por contener del orden del 25% de ácido úrico, aunque, desgraciadamente, se sepa también que el guano del Ártico está contaminado por materiales radiactivos procedentes de Chernobil.

En 1831 se fundó en Inglaterra la British Association for the Advancement for Science (Asociación Británica para el Avance de la Ciencia), como respuesta a determinados problemas surgidos en el seno de la Royal Societe. Uno de los actos de la Asociación de mayor trascendencia fue encargar a Liebig un informe sobre la Química Agrícola, que este asumió con tal entusiasmo, que no se limitó a las cuestiones de fertilidad sino que alcanzó hasta la producción alimentaria.

No hay duda de que este trabajo fue el punto de partida de la Química del Suelo y de la Nutrición, razones suficientes para que se le considere como el creador de la Química Agrícola.

La pérdida de capacidad productiva de un suelo agrícola como consecuencia de su uso reiterado era un hecho conocido desde hacía siglos, al igual que lo eran los intentos empíricos por impedirlo incorporando al suelo ciertos de residuos, como cenizas, huesos, materia orgánica, etc.

La literatura de épocas remotas es abundante en citas históricas, mitológicas y bíblicas de este tipo. En el primer milenio (b.C) hay alusiones al uso del estiércol en Homero (Odisea), Jenofonte, Teofrasto y algunos otros escritores. Este último se refiere también al salitre y al entierro de leguminosas como medio para mejorar el rendimiento de las cosechas, ¡lo cual, y aunque ignoraran la causa, era tener noticia de la fijación natural del nitrógeno atmosférico! Dos siglos después Plinio el Antiguo o el Naturalista vuelven a aludir al salitre para fertilizar las plantas, aunque debieran haber dicho los suelos, y hablan del empleo de salmuera en el cultivo de las palmeras. En el Código Deuteronomico (12.16) se prohíbe comer la sangre de los animales, que debe de ser derramada sobre la tierra como el agua. En la Biblia se encuentra un pasaje en el que el viñador pide al Señor que le autorice a no arrancar su viña durante un año por si después de cavada y abonada con estiércol diera fruto al año siguiente. Colmuela, en el siglo I, escribe un Tratado sobre Economía Agraria en el que insiste en la necesidad de devolver al suelo los residuos naturales, y ya en los más recientes siglos XVI y XVII, Palisy (1510-15877) y el Médico Botánico alemán Bäuer

(1672), éste en su Tratado de Agricultura, amplían el valor del estiércol al contenido de sus sales.

Todas estas citas tienen hoy su justificación puesto que el estiércol contiene nutrientes vegetales reutilizables, la sangre proteínas y por tanto nitrógeno, y las habas, como leguminosas tienen la virtud de fijar el nitrógeno del aire.

Pocas decenas de años después de iniciada la Agricultura como actividad económica del hombre sedentario, y pese a la baja población, se observó que el suelo se agotaba y se hacía improductivo. Se recurrió entonces a roturar nuevas tierras y aparecieron así los cultivos itinerantes.

En el siglo XIX, con Liebig a la cabeza, se estudiaron muchas cuestiones relacionadas con el crecimiento de las plantas y se buscó por vía experimental la identidad de los principales nutrientes y la forma en que podían ser más económicamente aportados. A lo largo del siglo se incrementó considerablemente el número de nutrientes conocido, hasta figurar entre ellos elementos tales como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, etc. Después, durante el siglo XX, se tuvo noticia de la necesidad de micronutrientes, en cuantía de ppm o de ppb, como hierro, flúor, cinc, cobre, manganeso, cromo, cobalto, etc, aunque con alguno de ellos la planta actúe sólo como trasmisor a los animales, en especial para el hombre, que los ingiere asociados a los tradicionales nutrientes de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

Pero no le fue fácil a Liebig que le aceptaran sus criterios. Mediado el siglo XIX todavía el Bureau of Soils del Departamento de Agricultura de USA, mantenía el criterio de que el suelo era una fuente inagotable de recursos minerales para las plantas, si los cultivos estaban adecuadamente dirigidos. Estimaba este Departamento que los buenos efectos de los fertilizantes no se debían a su función nutriente, sino a que destruían sustancias tóxicas del suelo, lo que por otra parte podía conseguirse por rotación de cultivos.

Para Liebig, sin embargo, la cuestión no tenía duda: las plantas tomaban del suelo sales minerales que, después, había que reponer para mantener la fertilidad. “Llegará un día -decía Liebig- en que según las clases de plantas de que se trate, se añadirá a los campos la cantidad que necesiten de sustancias minerales y estos abonos se producirán en grandes fábricas”. El siglo XX ha sido testigo de la certeza de esta afirmación y también de los abusos a que se ha sometido su aplicación, hasta el extremo de llegar a cuestionarse por su impacto contaminante.

Pero Liebig no sólo supo que las plantas necesitaban nutrientes, sino que sus requerimientos eran distintos, cualitativa y cuantitativamente, según la clase, a pesar de que entonces no pudiera precisarse ni el qué ni el cuánto. Estos hechos fueron avances importantes de la Química Agrícola, que tenían el valor de ser el resultado de aplicar el método científico a la interpretación y conocimiento de la nutrición vegetal, hasta entonces sumergida en el empirismo.

El progresivo conocimiento de los ciclos biogeoquímicos que participan en la nutrición vegetal, ha hecho del suelo algo más que un simple soporte. En varias ocasiones, personalmente, lo he definido como un reactor físico-químico y biológico, supuesto que es el lugar de confluencia y eliminación de residuos. En el suelo -decía el Prof. Albareda y completó más tarde otro cualificado Académico de esta Casa, el Prof Carpena-, se verifica el retorno de lo biológico a lo geológico hasta quedar en situación de reiniciarse el ciclo a lo biológico. Situación perfecta si no fuera porque sólo una parte del fotosintato de la planta se mantiene allí donde se genera; el resto se exporta para el consumo, lo que supone una pérdida de nutrientes que hay que reponer.

Esta pérdida es cada día mayor, merced a que determinadas mejoras genéticas, que casi siempre tienen su origen en causas económicas, como es el consumo de agua, han dado lugar a que el fotosintato útil de una planta, es decir el que se consume y exporta, haya aumentado considerablemente respecto del peso total de la misma; en los casos del arroz, trigo y maíz, la proporción de fotosintato útil puede alcanzar ya hasta el 50%.

El primer fertilizante fosfórico utilizado en Europa fueron los restos de huesos, aunque hacia 1830, y por iniciativa de Liebig, su eficacia se mejoró al tratarlos con ácido sulfúrico diluido, porque el fosfato tricálcico insoluble pasa a un fosfato ácido más soluble. Se llegaron a usar, incluso, huesos de osarios humanos. En 1843, John Lawes repitió el proceso con roca fosfórica, y obtuvo un fertilizante de gran eficacia al que se denominó superfosfato que, al igual que el producto tratado de huesos, además de fósforo aportaba azufre y calcio. Con posterioridad a 1950 se ha obtenido un producto concentrado tratando la roca fosfórica con ácido fosfórico, y más tarde se han desarrollado productos dobles, que contienen nitrógeno y fósforo bajo las especies de fosfatos mono y diamónicos, y triples que contienen los tres nutrientes básicos.

El nitrógeno se aplicaba inicialmente en forma de amoníaco, recuperado en la fabricación de coque y en la de gas del alumbrado. Más tarde se tomó del aire, primero como cianamida cálcica y a partir de 1913 por síntesis directa, según el método de Haber-Bosch. Todo ello indica que hoy no hay problemas para su disponibilidad. Pero hay algo singular que conviene no perder de vista: La fijación total del nitrógeno se evalúa en unas 275 MM de toneladas año, y de ellas sólo 70 MM proceden de síntesis, 30 MM tienen su origen en causas naturales o en actividades económicas antrópicas distintas a la síntesis de fertilizantes, y 175 MM proceden de fijación biológica. La primitiva práctica empírica de enterrar habas en verde quedó plenamente justificada cuando Hellriegel, en 1888, es decir, poco después del fallecimiento de Liebig, descubrió la fijación del nitrógeno atmosférico por la asociación simbiótica de bacterias del suelo tipo *Rizobium*, con plantas leguminosas. Es de esperar que, hacia el futuro, para disponer de nitrógeno fertilizante baste buscar la especie leguminosa más eficaz, o desarrollar al amparo de la Biología Molecular alguna con poder de fijación superior a los conocidos.

Las necesidades de potasio son menos críticas pues el elemento se encuentra en las arcillas y es de fácil meteorización. La sal más difundida es el cloruro potásico, producto natural con alto contenido de potasio; pero

como la incidencia del cloruro sobre la nutrición de la planta es negativa, y aquí hay otra prueba del avance de conocimientos en nutrición vegetal, se procura sustituir con nitrato o sulfato potásico. La importancia del potasio se debe a que forma parte del protoplasma celular e interviene en la fotosíntesis.

En poco más de medio siglo se ha pasado de la resistencia al empleo de fertilizantes a usarlos en demasía, lo que los convierte en contaminantes de los suelos, aguas y atmósfera. La de suelos y aguas es lógica, pero también ocurre en cuantía no pequeña la del aire porque el amonio en el suelo puede volatilizarse como amoniaco y es objeto de acciones bacterianas, en una de las cuales se transforma en N_2O , gas que contamina el aire y tiene un acusado efecto invernadero.

La fertilización ideal debe armonizar el suministro de nutrientes con las necesidades de la planta que se cultiva, que varían según la fase de crecimiento de aquella. Y para satisfacer esta exigencia, y evitar la contaminación por fertilizantes, se han desarrollado los fertilizantes de liberación lenta y, mejor aún, los de liberación controlada, sobre los que ya hace tiempo se trabaja con éxito bajo tres directrices: productos recubiertos, de baja solubilidad y control microbiano de nitrificación; las tres ofrecen excelentes perspectivas.

3. LIEBIG Y EL SUELO AGRÍCOLA

“La prosperidad de los pueblos depende de la duración de la fertilidad de suelo” decía Liebig en su obra sobre “Leyes Naturales de la Agricultura”. Sin embargo, él no valoró el suelo sólo como depósito de nutrientes o soporte de cultivo, sino como algo que participa íntegramente en la producción vegetal. Se trata de un sustrato heterogéneo en el que cada uno de sus componentes cumple una función productiva. En este sentido, y junto con su contemporáneo Boussingault, consiguió que se abandonara la hipótesis del humus como fuente exclusiva del carbono de las plantas, demostrando que el suministrador es el aire, a través del CO_2 , con lo que abre el campo al estudio

químico-agrícola del suelo y de las funciones de cada una de las tres fases heterogéneas que le integran: Sólida, líquida y gaseosa.

La fase sólida, de enorme complejidad, esta conformada por materiales inorgánicos y orgánicos; y entre estos hay microorganismos, organismos vivos y restos vegetales en diversos grados de evolución, entre ellos el humus, cada uno de los cuales realiza una función químico-agrícola específica, complementaria de la biológica que realizan los microorganismos. La fase líquida tiene una finalidad nutriente y de transporte de nutrientes, y la fase gaseosa es la base del mecanismo evolutivo de los materiales orgánicos y está formada un aire empobrecido en oxígeno y enriquecido en CO₂, que se expulsa a la atmósfera.

La parte húmica de la fase orgánica del suelo juega en el complejo edáfico un variado número de funciones. Le dota de una estructura estable y porosa que facilita el intercambio entre las fases sólida y líquida, mantiene la temperatura del suelo y amortigua sus variaciones gracias al color negro, incrementa la capacidad de retención de agua hasta llegar a ser veinte veces el peso de los ácidos húmicos, estabiliza el pH mediante sus grupos de ácidos débiles y básicos nitrogenados, tienen una capacidad de cambio catiónico, entre tres y nueve veces superior a la de la arcilla, le dota de una capacidad de cambio aniónico y de poder quelante, etc.

Una parte, no pequeña, de todos estos fenómenos procede de la época de Liebig, y aparece descrita en una obra de 1880 titulada “La Oficina de Farmacia Española”, aunque entonces no se supieran interpretar.

Abierto por Liebig este campo de estudio, se continuó después con indiscutible éxito por un considerable número de investigadores europeos, de los que buena parte fueron recopilados por nuestro compañero el Prof González González durante su intervención en la Sesión conmemorativa del centenario del nacimiento del Prof. Albareda celebrada el pasado año en esta Real Academia.

Pero en estos trabajos ya no eran sólo de Química Agrícola, sino de una nueva disciplina nacida a su amparo y enriquecida con la Física, la

Biología, la Geología, la Microbiología y la Fisiología Vegetal, que se denominó Edafología, y se ocupa del estudio científico del suelo en cuanto sirve de base para su aprovechamiento agrícola. Entre los primeros estudiosos de la Edafología hay que citar al ruso Vassili Vassilievith Dokuchaev (1846-1903), contemporáneo de Liebig (1846-1903), cuya tesis doctoral es un claro trabajo sobre Ciencia del Suelo.

Su introducción en España, incluso del nombre, se debe a Emilio Huguet del Villar (1871-1951), que en 1932 fue designado Director del Instituto Mediterráneo de Suelos, creado ese mismo año y desaparecido en 1939, aunque en 1942 bajo el impulso de Albareda se creaba el Instituto de Edafología.

Entre las publicaciones citadas por González en el artículo de referencia, y fundamentalmente en las relativas al segundo y tercer cuartos del siglo XX, aparecen nombres brillantes que también figuran en nuestro Anuario como Académicos de Número y que de alguna manera, o quizá de muchas, son continuadores de los trabajos de Liebig, inicialmente denominados químico- agrícolas. Junto al nombre de Albareda aparecen los de Santos Ruiz, Gutiérrez Ríos, Hoyos de Castro, Vicente Aleixandre, Lorenzo Vilas, el propio Gaspar González, etc, a los que todavía habría que añadir los igualmente Académicos de Número que, en un principio pertenecieron al “Club Edafos” y después siguieron nuevas directrices nacidas o convergentes con las anteriores como son Julio Rodríguez Villanueva, Manuel Losada, Manuel Ruiz Amil, sin olvidar al primer Catedrático de Química Agrícola, Octavio Carpena y al de Bioquímica de la Escuela de I. Agrónomos de Valencia, Eduardo Primo, quienes por su ubicación levantina dieron a sus trabajos una orientación más agrícola. Y permítaseme que cite también a mi Maestro y Director de Tesis Doctoral, Prof Burriel aunque no fuera Académico de esta Corporación.

En este momento, no se puede silenciar el grave problema de la contaminación ambiental. Si exceptúa la derivada de la aplicación de fertilizantes, antes aludida, y la de los fitosanitarios, el suelo es receptor pasivo de contaminantes andrógenos que distorsionan su estructura, alteran

su funcionalidad edáfica, merman su productividad agrícola y le convierten en agente transmisor de contaminantes y de enfermedades. De aquí que, hoy sea obligado mantener una intensa actividad investigadora con el objetivo de buscar de sistemas para proteger y descontaminar suelos, ambos de problemática difícil, y para potenciar su capacidad de autodepuración por vía degradativa o por fitoacumulación. Un ejemplo reciente de estas posibilidades se ha encontrado en el grave vertido de Aznarcollar, donde los científicos ya han seleccionado más de cien especies de plantas con capacidad para acumular metales.

4. LA ATMÓSFERA EN LA QUÍMICA AGRÍCOLA DE LIEBIG

El carácter integrador de la primitiva Química Agrícola aparece de nuevo al tomar como referencia la atmósfera. Tampoco este aspecto escapó a las observaciones de Liebig, que siempre consideró a “la Naturaleza como un todo en el que los fenómenos están unidos entre sí, como los nudos de una red”. Por ello, su búsqueda de los principios nutritivos de las plantas no se limitó al suelo sino que acudió también a la atmósfera, advirtiendo que no debía darse más importancia a unos que a otros. “Los de forma gaseosa son absorbidos por las hojas y los principios fijos por las raíces”.

En el momento actual el 75% del nitrógeno anualmente requerido por las plantas procede del aire, por fijación directa o indirecta, pero en todo caso, sin necesidad de síntesis química. No se tardará mucho en conseguir que lo sea en su totalidad.

Sin embargo, una de las mejores aportaciones de Liebig fue demostrar que las plantas captaban el carbono del CO₂ atmosférico. Se liberó así a la Agricultura de creer que procedía de los ácidos húmicos. El CO₂ se aporta a la atmósfera por la combustión de materiales carbonados y la respiración de los seres vivos, incluidos aquellos cuyos ecosistemas radican en el propio suelo, y desde allí lo vuelven a tomar las plantas.

Priestley, descubridor del oxígeno, y predecesor de Liebig, hizo la observación de que las plantas regeneraban el aire previamente viciado por la respiración animal. La regeneración consistía en liberar oxígeno. Pero Priestley se quedó corto en su observación, pues no hizo notar la necesidad de que la planta estuviera iluminada. Pocos años después, en 1789, el científico holandés Inghosonzs, completó el descubrimiento al hacer notar la dependencia del fenómeno de la luz del sol.

Parece lógico que esta información llevara a Liebig al convencimiento de que era el CO_2 la molécula suministradora del oxígeno “regenerador” y del carbono de las plantas, de manera que se trataba de una reacción inversa a la de la respiración o la combustión.

Pero esta reacción tendría que ser endotérmica supuesto que la inversa es exotérmica. Se trata, pues, de una reacción fotocatalítica, que precisa radiaciones de alta energía. En el espectro visible sólo las radiaciones azules son eficaces para las reacciones fotoquímicas energéticamente más difíciles. Sin embargo, como las plantas reciben una energía no seleccionada es lógico utilicen una cantidad que, es treinta o cuarenta veces mayor a la teóricamente necesaria para la fotosíntesis, razón por lo que la planta se defiende con una evaporación intensiva de agua.

Después, y poco a poco, se ha profundizando en el conocimiento de la fotosíntesis, y sin estar todavía definitivamente aclarado el fenómeno, o al menos sin los conocimientos suficientes para repetirlo artificialmente, se sabe que es un proceso complicado y que, aunque de difícil simplificación, puede resumirse en un fenómeno de acumulación de energía mediante las porfirinas, y en concreto de la clorofila que es la más abundante, que después se emplea en formar las primeras moléculas de hidratos de carbono, constituyendo una reserva energética a partir de la cual se construyen las moléculas más complicadas.

Con esto se cierra el ciclo de conversión de materiales abióticos en bióticos, el uso posterior de estos por los consumidores, y su postrer

agotamiento por los degradadores o simplificadores, de forma que les devuelven a su primitiva condición de abióticos.

Pero en esta transformación de abióticos en bióticos la materia experimenta cambios estructurales específicos, es decir, justo en el momento del cambio de la materia inanimada en animada, por lo hay que convenir que el ciclo lleva intrínscico algún escalón más.

Sausgruber, diferencia entre lo viviente y no viviente mediante cuatro puntos de referencia: Gases, cristales, aparatos y organismos. El gas es desorden eficiente y sin función. El cristal es orden eficiente e igualmente sin función. No cabe duda de que entre ambos hay una amplia gradación que va desde el desorden al orden entrópico. El aparato es, al igual que el organismo, orden eficiente y con finalidad, pero sin capacidad para su autorregeneración. En cambio el organismo es orden, eficiencia y finalidad que, además, tiene capacidad de autorregeneración.

La definición de límites está clara. Dista mucho de estarlo la explicación del cómo. La aparición de los primeros microscopios permitió a Hooke, hacia 1655, identificar en unas láminas de corcho unas celdillas que, en realidad, eran el esqueleto subérnico de las células creadas a partir de la celulosa formada en la fotosíntesis. Schleiden (en 1838) y Schwann (en 1840), ambos contemporáneos de Liebig, sugerían que la unidad estructural de la materia viva era la célula. La actual Teoría Celular ratifica este principio añadiendo “que toda célula procede de otra, a través de la cual se trasmite la información genética y que las reacciones químicas de un organismo, es decir su metabolismo, tienen lugar en las células” (Ayala).

A partir de ahí se ha progresado en el saber celular, hasta encontrar que algunos de los orgánulos de las células vegetales, los plástidos, tienen una especificidad estructural y fisiológica que los capacita para realizar variadas funciones que van desde la fotosíntesis a la acumulación de nutrientes (almidón, lípidos y proteínas). De este modo, y a partir de la primitiva Química-Agrícola, en poco menos de 150 años se ha llegado a la Biología Molecular.

EPÍLOGO

El recuerdo a Liebig en este segundo centenario de su nacimiento supera los límites del reconocimiento científico a su labor para convertirse en un auténtico deber social, que puede extenderse a cuantos sectores socio-económicos se enfrentan hoy con el problema del desarrollo sostenible.

En el siglo en que vivió Liebig el impacto social del desarrollo científico ya había iniciado su influjo sobre el aumento del nivel de vida de la sociedad. Este influjo se ha intensificado durante el último siglo y medio, hasta el punto de que las mejoras de la salud pública y de la alimentación han constituido un beneficio social indiscutible. Sin embargo, también se ha generado un consumo masivo de los recursos naturales, cual si estos fueran susceptibles de una demanda superior a la oferta, por tiempo indeterminado, sin riesgo para su recuperación.

Personajes como Liebig, al preocuparse por conocer los mecanismos de reciclado, prestaron un valioso servicio a las comunidades que iban a sucederle. Nuestra sociedad actual es deudora de aquellos investigadores, al igual que las futuras lo serán de los presentes. Una vez dada la voz de alarma, la Ciencia y la Técnica han aceptado el reto de mantener la sostenibilidad, incluso para una población cuatro veces superior a la de siglo XIX.

Por ello, en reconocimiento a Liebig y a cuantos han aportado algo en esta línea, quiero terminar con la glosa de unos versículos de un salmo (104: 13-15) que refleja la cosmogonía del Génesis sobre la capacidad reproductiva de la naturaleza:

De tus altas moradas abrevas las montañas
del fruto de tu cielo* hartas la tierra;
la hierba haces brotar para el ganado,
y las plantas para el uso del hombre,

para que saque de la tierra el pan;
y el vino recrea el corazón del hombre,
para que lustre su rostro con aceite
y el pan conforte el corazón del hombre.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ALBAREDA, J.M. (1943) “El suelo. Estudio físico-químico biológico de su formación y constitución” Ed. SAETA. Madrid.
- (2) ALBAREDA, J.M., SANTOS RUIZ, A. Y ALBIÑANA, T. (1944) “Materia Orgánica en suelos españoles. I Carbono” *Anal. Fis y Quim.* 39, 751-68.
- (3) ALBAREDA, J.M., SANTOS RUIZ, A Y ALBIÑANA, T. (1944) “Materia Orgánica en suelos españoles. II. Nitrógeno y razón C/N”. *Anal. Fis. Quim.* 40. 84-97.
- (4) ALBAREDA, J.M. Y GUTIÉRREZ RÍOS, E. (1942) “Sobre el estudio de los suelos españoles” *Rev. Uni. Madrid* . T.2. Fasc V 3-21.
- (5) AYALA, FRANCISCO J. (2001) “La evolución y la herencia biológica”. En “La Ciencia en tus manos”. Pedro García Barreno (Director). Editorial Espasa Calpe. Madrid.
- (6) BERNAL, JOHN D. (1967) “Historia Social de la Ciencia”. Ediciones Península. Barcelona.
- (7) CARPENA ARTÉS, O. (1976) “Aspectos físicoquímicos de la nutrición vegetal”. Discurso de Ingreso como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia. Madrid.
- (8) FERNÁNDEZ SANTAREM, JUAN. (2001) “La célula”. En “La Ciencia en tus manos”. Pedro García Barreno (Director) Editorial Espasa Calpe. Madrid.
- (9) GLOBOT, EDMONT.(1946) “El sistema de las ciencias” Editorial El Ateneo. Buenos Aires.
- (10) GONZÁLEZ GONZÁLEZ, G. (2002) “José M^a Albareda Herrera: artífice de la Edafología española.” *Anal. Real Acad. Nac. Farma.*, Vol LXVIII, 2, 175-192.
- (11) HOYOS DE CASTRO, A. (1974) “Pasado, presente y futuro de las relaciones entre el hombre y su ambiente”. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia. Madrid.

- (12) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1992) (coordinador) “Fertilizantes de Liberación Lenta”. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.
- (13) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (2001) “Directrices y Perspectivas de la Investigación”. En “Desarrollo e Innovación en la Industria Química”. FEIQUE.
- (14) JIMÉNEZ GÓMEZ, S. (1994) “La materia orgánica edáfica, factor limitante en la Agricultura”. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, Vol LX, 3, 437-461.
- (15) LIEBIG, v.J. (1877) “Leyes Naturales de la Agricultura”. Edición francesa revisada por el autor. Paris. Librairie agricole el de la Maison Rustique.- (Tomado de “El aire, el agua y las plantas” de Lino Peñuelas. Ministerio de Fomento. Madrid.
- (16) MUÑOZ, A. (Editor). (2002) “Recursos Mundiales” Ecoespaña Editorial. Madrid.
- (17) POLO, A., HERNÁNDEZ, D. Y FRITIS, H. (2002) “Contaminación y Restaruración de suelos. En “Ciencia y Medio Ambiente” F. Valladares (editor). Centro de Ciencias Medioambientales. Madrid.
- (18) PORTA, J., LÓPEZ ACEVEDO, M. Y ROQUERO, C. (1999) “Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente”. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- (19) READ, JOHN. (1960) “Por la Alquimia a la Química”. Edi. Aguilar.
- (20) SAUSGRUBER, KURT. (1959) “El átomo y el alma” Editorial Herder. Barcelona.
- (21) SCHNERTB, ROBER. (1969) En “Historia General de las Civilizaciones” Vol VI “El Siglo XIX”. Ediciones Destino. Barcelona.
- (22) TISDALE, S.L. Y NELSON, W.L.(1977) “Fertilidad de los suelos y fertilizantes” Editorial Monttaner y Simón. Barcelona.

Sesiones Científicas

3 de septiembre

A las 19'00 horas, Presentación de la Farmacopea Martindale, que contó con la asistencia de la Excm. Sra. Ministra de Sanidad y Consumo.

2 de octubre

A las 19'00 horas, Conferencia por el Excmo. Sr. Don Bartolomé Ribas Ozonas, titulada: "Impacto Ambiental de medicamentos y productos químicos"

6 de octubre

A las 19'00 horas, Sesión Conmemorativa del Bicentenario del Nacimiento de Liebig, en la que intervinieron los señores:

1º Apertura por el Excmo. Sr. Don Antonio Portolés Alonso.

2º Excm. Sra. Doña M^a Carmen Francés Causapé "Justus Liebig: Un docente en Química Orgánica y su influencia en la Farmacia Española". 3º Excmo. Sr. Don Gaspar González González "Liebig: un hito en la Agronomía del siglo XIX".

4º Excmo. Sr. Don Segundo Jiménez Gómez " La Química Agrícola de Liebig: Una integración de conocimientos".

5º Excm. Sra. Doña Carmen Avendaño López "Relevancia de Liebig en el desarrollo de la Química Orgánica".

6º Excmo. Sr. Don Bernabé Sáenz Pérez "Liebig y la Nutrición".

7º Prof. Dr. Wolf Dieter Müller Jancke "Justus von Liebig et la Pharmacie Allemande".

8º Clausura por el Excmo. Sr. Don Juan Manuel Reol Tejada.

7 de octubre

A las 12'30 horas, Sesión sobre “Los Rivas”. Conferencia por el Excmo. Sr. Don Federico Mayor Zaragoza, titulada: “Desarrollo sostenible”.

A las 19'30 horas, Mesa Redonda sobre “Los Rivas”, Presidida por el Excmo. Sr. Don Juan Manuel Reol Tejada, introducción a cargo de los Excmos. Sres. Don José Enrique Hours Pérez y Don Salvador Rivas Martínez y con la participación de los Prof. Dres. Don Francisco Díaz-Fierros Viqueira, Doña M^a Rosario de Felipe Antón, Don Manuel Costa Talens y Don Jesús Izco Sevillano.

9 de octubre

A las 19,00 horas, Conferencia por el Dr. Amando Garrido Pertierra, Académico Correspondiente, titulada: “Anemias Hemolíticas y deficiencias en Piruvato Quinasa”.

16 de octubre.

A las 19'00 horas, Conferencia por el Excmo. Sr. Don Juan Ramón Lacadena Calero, titulada: “Bioética y Genética: Un dialogo plural”.

20 de octubre

A las 19'00 horas, Acto del Instituto de España en Homenaje al Excmo. Sr. Don Manuel Lora Tamayo. Intervinieron los Presidentes de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Real Academia Nacional de Farmacia y el Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

23 de octubre

A las 19'00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Ruben Hilario Manzo, quien pronunció su discurso titulado: “Algunas contribuciones en la investigación y



desarrollo de nuevas drogas y sistemas de liberación modificada de drogas”.

29 de octubre

A las 19'00 horas, Mesa Redonda de Aguas Mineromedicinales sobre los Balnearios de Jaraba en la que se dieron cuenta de los siguientes trabajos:

“Análisis de la radiactividad en las aguas de los Balnearios de Jaraba”, Prof. Dr. Don Juan Palomares López.

“Los Suelos del Término de Jaraba”, Prof. Dr. Don Francisco Monturiol Rodríguez.

“ Acción terapéutica de las aguas en los Balnearios de Jaraba”, Prof. Dra. Doña Josefina San Martín Bacaicoa y el Prof. Dr. Don Agustín Valero Castejón.

30 de octubre

A las 19,00 horas, Acto de la Fundación José Casares Gil. Mesa Redonda: El Instituto Carlos III y la Investigación. Conferencia dictada por el Ilmo. Sr. Don Antonio Campos Muñoz, Director del Instituto de Salud Carlos III, titulada: “ La investigación sanitaria en el Sistema Nacional de Salud”. Conferencia dictada por el Ilmo. Sr. Don Manuel Carrasco Mallén, Subdirector General de Investigación Sanitaria, titulada: “ Programas del Fondo de Investigación Sanitaria”. Conferencia dictada por el Dr. Don Jorge Veiga de Cobo, Director de la Biblioteca Nacional de Ciencias de la Salud, titulada: “Biblioteca Virtual en Salud”

6 de noviembre.

A las 19'00 horas, Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Dra. Doña Evangelina Palacios Alaiz, quien pronunció su discurso titulado: “Dianas en la terapia frente al cáncer: la encrucijada ceramida/glucosil ceramida”.



10 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Luis Villalonga Martínez titulada: “Historia de la Guerra Química. Características y mecanismos de aplicación en la Guerra y en el Terrorismo”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “Toxinas procedentes de hongos y de plantas”.

11 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Juan del Rey Calero titulada: “Los Microorganismos como agresivos. Historia. Características y aplicaciones”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Armando Merino titulada: “Agresivos bloqueantes de la cadena respiratoria”

12 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez titulada: “Agresivos incapacitantes, fumígenos, estornudógenos. Gases asfixiantes y vesicantes”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “Ingeniería genética aplicada a la obtención de nuevos agresivos microbiológicos”.

13 de noviembre.

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Jesús Gestal Otero titulada: “Agresivos neurotóxicos”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “Las toxinas microbianas como agresivos”.

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académica Correspondiente de la Dra. Doña Emilia Muñoz, quien pronunció su discurso titulado: “Sistema GH/Prolactina y crecimiento prenatal”.

17 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “Estudio especial del carbunco”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas titulada: “Desfoliantes. Agente naranja. Otros agresivos ecológicos”.

18 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “Estudio especial de la viruela”.

Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. José Ramón Pardo de Santayana titulada: “La guerra química y la microbiología ante el Derecho Internacional”.

19 de noviembre

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”



Conferencia a cargo del Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona titulada: “La guerra como problema de Salud Pública”.

20 de noviembre.

“Ciclo de conferencias sobre: “Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y en el terrorismo”

Visita a la Escuela de Defensa Militar NBQ

Conferencia a cargo del, Ilmo. Sr. D. Manuel Monroy titulada: “Estructura orgánica y misión de la Escuela de Defensa Militar NBQ”

Conferencia a cargo del Ilmo. Sr. D. René Pita Pita titulada: “Medios de prevención y descontaminación”.

A las 19'00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Don Andrés Amarilla, quien pronunció su discurso titulado: “Fluorescencia de Complejos de Lantano-tetracilina en leucocitos periféricos de sujetos normales y con leucemia”.

27 de noviembre.

Sesión Conmemorativa de los Premios Nóbel de Química y en Fisiología o Medicina. Coordinador: Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero. Conferenciantes: Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez quien pronunció su conferencia: “Poros y canales regulan la actividad celular”; Dr. Joaquín Ferreirós Domínguez quien pronunció su conferencia: “Impacto de la Resonancia Magnética en la Medicina actual”.

4 de diciembre

Toma de posesión como Académico Correspondiente del Dr. D. Alfredo Carabot Cuervo, quien pronunció su discurso titulado: “Búsqueda y caracterización de compuestos con actividad biológica en plantas del Amazonas Venezolano”.

11 de diciembre

208



Toma de posesión como Académico Correspondiente del Sr. D.l Maharit P. Gupta, quien pronunció su discurso titulada: “Investigaciones Farmacognósticas sobre la Flora Panameña.





Noticias

El Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas ha sido investido Doctor “Honoris causa” el 6 de septiembre de 2003 en Ciencias Ambientales por la Universidad de Ansted (Malaysia), ceremonia que ha tenido lugar en la London Metropolitan University

* * * *

Al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva le ha sido otorgada la Medalla “Jaime Ferrán” de Microbiología, máxima distinción de la Sociedad Española de Microbiología y de la cual se le hizo entrega el día 24 de septiembre de 2003 durante la celebración del Congreso Nacional de Microbiología y en la Universidad de Santiago de Compostela.

* * * *

El Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera, ha tomado posesión el día 24 de octubre de 2003 como Académico de Honor de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Galicia , acto en el que pronunció el discurso titulado “Aproximación nutricional a la dieta del peregrino en el Camino de Santiago”.

* * * *

El Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez ha sido objeto de un homenaje por parte de la Universidad de Verano de Teruel como reconocimiento a su extraordinaria trayectoria docente y profesional y a sus sobresalientes méritos académicos y científicos, homenaje que tuvo lugar el día 24 de octubre de 2003 en el Salón de Actos del Museo Provincial de Teruel.

* * * *

El Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García ha sido nombrado durante el año 2003: Académico de Honor de la Academia de Ciencias



Farmacéuticas de Chile, Académico Correspondiente de la Academia Peruana de Farmacia, Profesor Honorario de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Lima (Perú) y Presidente de la European Association of Faculties of Pharmacy.

* * * *

El Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada ha tomado posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Hispano Americana de Ciencias, Artes y Letras de Cádiz el día 13 de noviembre de 2003.

* * * *

V Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas: Discurso Inaugural

JOSÉ AMIEL PÉREZ

Presidente de la Academia Peruana de Farmacia

Sr. Mg. Huber Rodríguez Nomura

Rector de la Universidad Nacional de Trujillo

Doctora Bertha Pareja Pareja

Presidente del V Congreso de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

Sr. Mg. Segundo Roncal Saldaña

Vicepresidente del Congreso y Secretario General de la Universidad Nacional de Trujillo

Sr. Mg. Felipe Temoche R.

Vicerrector Administrativo de la Universidad Nacional de Trujillo

Sr. Mg. Werenson Gonzáles Ramos

Perfecto del Departamento de la Libertad

Sr. Dr. Wilson Torres Ríos

Presidente de la Alianza Binacional Perú-Ecuador de las Ciencias Farmacéuticas y de la Delegación Ecuatoriana a este Congreso



Sr. Dr. Carlos Sabana Gamarra

Decano de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo

Sr. Ing. Jorge Flores

Decano de la Facultad de Ingeniería Química

Sr. Dr. Arístides Távara

Decano de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas

Sr. Dr. Orlando Velásquez

Decano de la Facultad de Ciencias Sociales

Señores Invitados Especiales

Señores Académicos Correspondientes, de Número y Asociados

Autoridades y Docentes de la Universidad Nacional de Trujillo

Señoras y Señores

Hoy damos inicio al V Congreso Nacional que se celebra en esta histórica y hermosa ciudad plétórica de Cultura, Arte, Ciencia y Tecnología, Congreso que se realiza como homenaje a los 50 años de creación de la Academia Peruana de Farmacia.

Permítaseme en primer lugar agradecer la proverbial hospitalidad de esta generosa tierra y en particular de la Universidad Nacional de Trujillo, que se ha prodigado, conjugando tareas con nuestro Comité Organizador, para realizar un evento de muy alto nivel científico y en el que participan docentes y alumnos de ésta y otras universidades del país, para confrontar juntos los avances científicos recientes, comunicar nuevos aspectos profesionales que son lógica consecuencia de los extraordinarios cambios en la dinámica actividad del Químico Farmacéutico. Congreso que hará posible estrechar cordiales lazos de confraternidad entre los miembros que ha congregado esta cita extraordinaria de investigación y ciencia, en el que disfrutaremos con conocimientos, técnicas y previsiones futuras que traen nuestros ilustres invitados del país y del extranjero que han acudido presurosos a nuestro llamado.

Para todos ellos nuestro inmensa gratitud, para el Sr. Rector, Dr. Huber Rodríguez, para las autoridades y docentes de esta noble



Universidad, para el Dr. Fernando Cabieses Rector de la Universidad Científica del Sur, quien no solo vendrá a dictarnos interesantes y sorprendentes Conferencias sino que estará con nosotros durante toda la realización del Congreso, a nuestros invitados especiales que han venido de España, Profesores Antonio Monge, Manuel Machuca González y José María Gonzales de la Riva; de Gran Bretaña, Profesor Jerome Reinstein; de Estados Unidos, Profesor Andrés Malavé; de Chile, Eda Costa Castro; de Uruguay, Cosme de los Santos Carvallido y distinguidos conferencistas de Lima, a todos los miembros de este Congreso, profesionales y alumnos; y de modo particular nuestro agradecimiento a la Dra. Berta Pareja, Presidenta del Comité Organizador y a su destacado grupo de trabajo, en particular a su Vicepresidente el Dr. Segundo Roncal Saldaña y a su Secretario Ejecutivo Profesor José Juárez cuya dedicación, experiencia y entusiasmo ha hecho posible este evento.

Nos alegra mucho recibir a la Delegación Ecuatoriana conformada por 12 Profesores y 22 alumnos de la Universidad de Machala que han venido a compartir con nosotros ciencia, cultura y amistad; y a la numerosa delegación de estudiantes bolivianos que nos acompaña hoy.

Efectivamente, y según reza en la Escritura de Constitución de la Academia Peruana de Farmacia “El primero de diciembre de 1952, a iniciativa del Dr. Ángel Maldonado, se reunieron en la Av. Colombia 295, del distrito de Pueblo Libre, los Doctores Fortunato Carranza S., Gonzalo Gurmendi Robles, Marco Antonio Garrido Malo, Julio López Guillén y Juan de Dios Guevara R. Con el propósito de crear una Institución de alto nivel científico dentro del campo de las ciencias farmacéuticas y con la finalidad de fomentar, preservar y recuperar la salud humana, la salud animal y el medio ambiente. De manera específica esta finalidad se centra en promover la salud del individuo como parte integral de su dignidad y el bien común de la sociedad, la investigación, la enseñanza, aplicación, difusión y gestión en el cultivo de las ciencias de la profesión químico-farmacéutica, contribuyendo al desarrollo intelectual relacionado a este campo, creándose así la ACADEMIA PERUANA DE FARMACIA”.

Debemos destacar de manera especial la significativa y determinante participación de la Real Academia de Madrid, algunos de cuyos miembros titulares y correspondientes nos honran hoy con su



presencia, la que permanentemente alentó a concretar sus anhelos a quienes se vislumbraban como los probables organizadores de la Academia; y para acrecentar más aún este estímulo a favor de su creación, incorporó a su seno a todos los fundadores antes mencionados. Ellos culminaron las sesiones preparatorias y suscribieron el Acta de la Fundación en Sesión Solemne realizada el 1º de diciembre de 1952. El Dr. Huberto Zapata Rivas, segundo Secretario Perpetuo de la Academia, agrega a la relación anterior la incorporación posterior de distinguidos farmacéuticos peruanos, Rodolfo Gálvez Souza, Fernando Montesino Ampuero, y que duda cabe la del Dr. Simón Pérez Alva, nuestro actual Presidente Honorario.

Señala asimismo Zapata Rivas, que en los años previos a la creación de la Academia, las ciencias farmacéuticas y la profesión habían alcanzado un gran desarrollo gracias a la esforzada labor de muy destacados maestros, pioneros visionarios; investigadores y hombres de ciencia que desde sus Cátedras alentaron a los profesionales a bregar por un mejor porvenir para la farmacia en el Perú.

La Universidad de San Marcos y la Universidad Nacional de Trujillo ya habían preparado numerosas promociones de Químicos Farmacéuticos formados con calidad de excelencia, con conocimientos, destrezas y competencias que los ubicaban en lugar preferente en Latinoamérica.

Por el año 1952 la farmacia del Perú contaba con una naciente industria del medicamento de la cual Ángel Maldonado fue uno de los impulsores más relevantes al desplegar importante tarea en los Laboratorios Maldonado, creado con su hermano Eduardo muchos años antes (1923)

Hombre de conocimientos claros y espíritu crítico, con extensa producción científica Maldonado exhibe excelsa y coherente vocación de naturalista. Su iniciativa de crear la Academia Peruana de Farmacia revela la hondura de su pensamiento y una personalidad de excepción que se aprecia al examinar su currículo amplio y de las más altas y meritorias calificaciones: Doctor en Farmacia de la Universidad de La Sorbona de París, Doctor en Ciencias Naturales y Director de la Escuela de Farmacia en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos entre 1927 y 1930,



Presidente de Instituciones y Congresos, Miembro de Organizaciones científicas y Academias, Miembro titular de la Academia Nacional de Medicina desde 1922, de la Academia de Química del Perú, Miembro Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia de Madrid, de la Academia de México (1925), de la Academia Nacional de Farmacia de París, de Cuba, Miembro Honorario de la Academia Nacional de Brasil y muchas otras Academias y sociedades del Perú y del Extranjero, por lo menos 43 sin contar distinciones que lo incorporaron a Universidades del Extranjero. Era pues, inevitable que el Dr. Ángel Maldonado concretara su sabio pensamiento y tomara la iniciativa para la fundación de la Academia. El Profesor Luis Pisan, Presidente de la Sociedad Peruana de Historia de la Farmacia de la que Maldonado fuera Miembro Honorario, nos ofreció los datos de su currículo en el que se destaca a Ángel Maldonado como Presidente fundador de la Academia Peruana de Farmacia.

En 1953, el 27 de marzo, se elige la junta de gobierno, el primer Consejo Directivo que reemplazó a la Junta Provisoria. Su instalación fue saludada por el Diario “El Comercio” comentando que se completan las Entidades Farmacéuticas responsables de su orientación científica: La Facultad de Farmacia y Bioquímica, en donde se recibe la enseñanza, la Federación de Químico-Farmacéuticos para el gobierno y defensa de la profesión y la Academia Peruana de Farmacia, que fomenta las ciencias farmacéuticas.

Figura notable de la Academia fue otro de sus fundadores y Presidente, el Dr. Fortunato Carranza, que luego fuera Rector de la UNMSM, científico y filósofo publicó valiosas obras de estímulo a la tarea investigadora y científica del docente y profesional farmacéutico; entre ellas “Con un interés en la mente”. En ella nuestro Maestro nos dice:

“UNA LUPA EN LA MANO AGRANDA NUESTRA VISIÓN OBJETIVA DEL MUNDO, UN INTERÉS EN LA MENTE PUEDE SER LA GERMINACIÓN DE LA FILOSOFÍA QUE NOS CONDUCE AL DESARROLLO DE LA VERDAD OBSERVADA DESPEJANDO NUEVAS VERDADES”



“UNA LUPA EN LA MANO PUEDE LLEVAR A LA VERDAD CIENTÍFICA; PERO UN INTERÉS EN LA MENTE PUEDE CONTRIBUIR A EDUCAR UNA VIDA, A ORIENTAR UNA CONDUCTA, A SERVIR UN DESTINO”

“PERO CON UNA LUPA EN LA MANO Y CON UN NUEVO ESFUERZO EN LA MENTE NUESTRA OBSERVACIÓN ALCANZARÁ UN MAYOR HORIZONTE”

Fortunato Carranza nos dejó muy valiosas enseñanzas, pero por encima de todo fue un faro, un atalaya que en el presente nos permite otear el camino recorrido y nos proyecta al futuro proclamando un credo de optimismo que convierte en formidable cualquier actividad farmacéutica, a condición de ser realizada en favor de la comunidad necesitada de salud.

El Dr. Marco Antonio Garrido Malo ha sido uno de los presidentes que más tiempo ejerció el cargo más elevado de la Academia. Él consolidó los criterios que delinearón la estructura y actividades de la Academia, ensanchó su ámbito y le otorgó un bien ganado prestigio, difícil de igualar, habiéndose en sus períodos instaurado la Primera Reunión Latinoamericana y Bioquímicas; a ellos les siguieron la II Reunión de Santiago (Chile) y la III Reunión en Montevideo (Uruguay), y la IV en Buenos Aires (Argentina). Y a éstas el Primer y Segundo Congreso de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Ya estamos en el V Congreso.

Marco Antonio Garrido, hombre polifacético, de mente lúcida, profundo en su pensar y brillante conductor de generaciones de farmacéuticos ha tenido singular éxito como educador, además de Decano llegó al alto cargo de Director Universitario, exitoso industrial, fundador y propietario de uno de los Laboratorios Industriales Farmacéuticos más importantes del país y del primer Laboratorio Biotecnológico-SINQUISA- Llegó a convertirse en uno de los políticos más hábiles en las Cámaras de Diputados y Senadores del Congreso de la República, propiciando Leyes trascendentes para el desarrollo de diversas actividades económicas, educativas y gremiales. Fue uno de los más exitosos creadores de instituciones científicas y sociedades profesionales.



Aún y a pesar de las múltiples y tan variadas actividades que consumieron mucho del valioso tiempo de Marco Antonio Garrido Malo, en su largo batallar de más de cuatro décadas, se constituyó en un Maestro Universitario e Investigador Científico excepcional, dejando una estela luminosa en toda actividad que realizaba a favor de sus discípulos, de la sociedad, de la Academia. En la cátedra mantuvo un don de enseñar que a la vez ilustraba, deleitaba a su auditorio mostrando didácticamente la versatilidad de sus nutridos conocimientos. Autor de textos universitarios, obras científicas, artículos y ensayos diversos fue el iniciador de numerosas publicaciones que hasta el día de hoy se editan. Diseñó los Anales de la Academia que luego se convirtieron en nuestra Revista. Infortunadamente en 1933 debió dejar la dirección activa de la Academia, postrado, al afectarse su salud tan gravemente que le impedía toda actividad. Había trabajado intensamente y por muchos años a favor de la Academia y dejado una estructura ágil y moderna.

El Dr. Juan de Dios Guevara ha sido, no cabe duda alguna, el Químico Farmacéutico peruano más notable de todos los tiempos. Parecería ocioso recordar una y otra vez sus elevadas cualidades, sus inconmensurable obra, la profundidad de su saber, sus excelsas virtudes personales, su caballerosidad, su bondad cristiana, como pocos han podido detentar vez alguna; su hondo y enorme bagaje de conocimientos científicos, lo convierten en una figura que los químicos farmacéuticos debemos rememorar y reverenciar.

Los suyos fueron 67 años de vida profesional dinámica y fructífera dedicada a la enseñanza universitaria, al esfuerzo investigador, a consolidar y encumbrar instituciones, vida impregnada de generosa contribución a la sociedad, desde sus inicios como ayudante de Química Analítica en la Escuela de Farmacia, que desarrolló en un ambiente de inquietud e incertidumbre en 1936, tras la reapertura de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y después de algunos años de receso, hasta su investidura como Rector en la misma, responsabilidad que ejerció por más de 8 años. Paralelamente fue designado al cargo de Presidente del Consejo Nacional de la Universidad durante 6 años (Entidad muchísimo más importante que la hoy Asamblea de Rectores).



Dos veces elegido Decano de su Facultad de Farmacia y Bioquímica, fue presidente de muchas instituciones y sociedades, recibió numerosas distinciones, premios y títulos honoríficos que esta noche es imposible reseñar. Autor de numerosas publicaciones, libros, revistas, artículos periodísticos, fue el editor y mantuvo en la altísima calidad que reconocemos el Boletín de la Sociedad Química del Perú, de lejos, la Revista Científica más antigua en su género en el Perú.

Guevara fue esencialmente un eminente profesor de Química Orgánica. Brillaba por la sencillez y claridad de su exposición como por la solidez de sus conocimientos. Era un orientador de juventudes formidable, en sus discursos jamás olvidó una palabra de aliento para los jóvenes estudiantes expresándoles siempre su credo de fe en el destino de su universidad y de su futuro profesional. Mantuvo siempre viva la llama del saber y la cultura.

Durante su gestión en la Academia reformó sus Estatutos ampliando el número de asientos para los miembros de número y otorgando a los miembros asociados niveles de participación antes impensadas. Consecuente con esta política incorporó numerosos miembros que hoy dan vida y prestigian a nuestra Academia. Transcribiremos un párrafo del Discurso-Memoria del Dr. Guevara en 1999: “El evento cumbre de la Academia, desde 1992, ha sido el Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; el primero se llevó a cabo con la presidencia del Dr. Simón Pérez Alva. El Segundo en 1994, con la Presidencia del Dr. José Amiel Pérez. El III Congreso en 1996, se efectuó bajo la presidencia del Dr. Rubén Gil Salas, esforzado miembro de nuestro Consejo, con quien comparto la dirección de la Academia y el IV Congreso en 1999 con la presidencia del Dr. Fernando Quevedo Ganoza. Anecdóticamente, 3 de los 4 presidentes mencionados somos trujillanos.

A las cualidades extraordinarias que unen al científico y al maestro, mi maestro y amigo, Juan de Dios Guevara aún otras cualidades, más dignas aún de nuestro homenaje: un alma bella y un gran corazón; nunca escatimó su tiempo ni su persona, fue un espíritu forjado en la universidad, taller de grandes ideales y escuela de ilustres científicos. Su palabra mantuvo el cálido aliento de quien no perdió nunca



sus virtudes sencillas a pesar de las horas duras que hubo de superar, gracias a su fe inmovible en Dios; digno y grave a la vez, llano y cordial y sobre todo con un increíble sentido del equilibrio y un culto sin quebranto de la verdad. Poseía una cultura que iluminaba la mente de los hombres preclaros. Trajo el prestigio de los hombres de saber y de la ciencia peruana, portando el propio prestigio de su vasta obra científica cumplida. Honor al sabio, al amigo, al Hombre.

Fueron seis heraldos que anunciaron la buena nueva de la creación de la Academia, mencionamos ahora al notable profesor de Química Analítica y Decano de la Facultad, Dr. Gonzalo Gurmendi. Sus dotes de maestro que hicieron inconfundibles sus clases y su cariño e identificación con la cultura farmacéutica nos muestran al destacado profesor que conocimos y apreciamos. La vastedad de su obra es tan amplia como las antes reseñadas, pero el corto tiempo que nos queda no posibilita mayor extensión, como deberíamos, a la figura y prestancia del Dr. Gurmendi.

El Dr. Julio López Guillén, el último de los “seis”, también Decano de la Facultad, tuvo infatigable y sobresaliente actuación al frente de la Dirección de Farmacia. Dio un gran paso para el gran desarrollo de la industria farmacéutica al lograr la promulgación de un dispositivo legal por el que se involucraba a la industria farmacéutica en la ley General de Protección Industrial, de la que esta actividad había sido exceptuada. Los Laboratorios Farmacéuticos multinacionales se vieron obligados así a desarrollar sus instalaciones en el Perú. La mayoría comenzó a fabricar sus medicamentos en el país, dando trabajo a muchos químicos farmacéuticos y transfiriendo moderna tecnología.

Merece una especial distinción el Dr. Simón Pérez Alva, nuestro Presidente Honorario, quien fuera Decano de la Facultad de Farmacia y Vicerrector de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Hoy no nos acompaña por razones de salud.

Pérez Alva ha sido y es el investigador científico farmacéutico más relevante en Latinoamérica. Microbiólogo notable y acucioso. Ya desde estudiante mostró sus habilidades para la ciencia de los “microbios”, analizando bacteriológicamente las aguas de bebida de esta ciudad, Trujillo, su tierra natal. Muchísimos son sus trabajos posteriores,



desarrollados particularmente después de su regreso de Francia; al terminar sus estudios fue becado al Instituto Pasteur de París, en donde aprendió técnicas microbiológicas e inmunológicas que implementó en San Marcos a su regreso.

Abordó con pasión y sin descanso problemas nacionales, como el de la bartonella y superó la casi total ausencia de vacunas preparadas con cepas locales, que otorgaron mayor especificidad y eficacia a estos preparados netamente regionales. Trabajó intensamente para darle contenido científico al tema de las alergias. Preparó los primeros alérgenos en el país e hizo importantes estudios acerca de los hongos ambientales. La relación de investigaciones es enorme. Recientemente estuvo trabajando en diversos tópicos del área de Biotecnología y fermentaciones industriales, siendo el creador e impulsor de la Maestría en Biotecnología. Investigó con tesón y perseverancia. Fundó el primer laboratorio industrial microbiológico en el Perú: Laboratorios Biossa.

En calidad de Profesor Emérito ha seguido trabajando y publicando sin desmayo, a pesar de los días difíciles que debió pasar con su salud afectada. Al evaluar su obra científica y recordar las inclinaciones literarias de Fortunato Carranza, no escapamos a la verdad si afirmamos que Pérez Alva es aquél es aquél de “con una lupa en la mano y un interés en la mente”. Para Simón Pérez Alva, nuestro cálido y afectuoso homenaje, al gran maestro, al investigador apasionado, al infatigable conductor institucional y a un noble espíritu cuya entereza nos hace vislumbrar la continuidad y enriquecimiento permanente de nuestro destino histórico. A él, que con espíritu indomable venció todos los obstáculos que encontró en su camino de investigador, nuestro más vivo, más cálido Homenaje. A él nuestras cariñosas palabras de afecto y gratitud. Es la gran ausencia del más encumbrado académico a esta Reunión de Ciencia y evocación.

Vivimos en este día momentos gratos, de inolvidables recuerdos. Nuestra reflexión humana no renuncia ni renunciaría a la sinceridad del latido de cada época, reverente ante el esfuerzo múltiple de mentes creadoras que fueron capaces de imponer en nuestra vida ritmos de trabajo, progreso y doctrina farmacéutica, mentes que descubrieron y reafirmaron nuestras legendarias riquezas; antes ideas puras y de noble



idealismo, pero ellos nos las impusieron como necesidad de acción, leal e inteligente respuesta al llamado de nuestra inmensa población carente de recursos que requiere cubrir apremiantes requerimientos en materia de salud.

Ya en otros tiempos, otros hombres hicieron vibrar en este mismo recinto voces de esperanza. Y henos aquí después de casi 17 años, retornamos a esta bella ciudad portando el mismo pensamiento, que reflejaba la expresión vibrante de renovados anhelos. Efectivamente, en noviembre de 1986 la Academia Peruana se sumó con entusiasmo desbordante a los Actos de Celebración de las Bodas de Oro de los Estudios de Farmacia en la Universidad Nacional de Trujillo y trajo una delegación gozosa y alborozada constituida por todos los miembros de su Consejo Directivo, además de un número importante de Académicos, habiendo el día viernes 28 de noviembre incorporado en su seno, como académicos de número, a los Doctores Augusto Aldave y Arnaldo López Miranda.

Señor Rector, señoras y señores:

Hoy la Universidad de Trujillo nos devuelve con creces ese gesto solidario de 1986 y nos brinda generosa el claustro donde florecen ideas e ideales, crisol de ciencia y esperanza para un Perú mejor. Aquí, pues, estamos en Trujillo para dar inicio con esta Sesión Solemne al V Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, estamos en Trujillo para incorporar a la Academia a 4 nuevos académicos del Norte Peruano, los doctores Roncal, Sabana, Yon de Préntice y Montenegro y asimismo dos miembros correspondientes que vienen desde Gran Bretaña, Jerome Reinstein y desde los Estados Unidos, el profesor Andrés Malavé. El hacerlo aquí, señores, es verdadera descentralización. Al finalizar este evento el próximo 24 de mayo en la noble y fecunda tierra trujillana, también nuestra tierra, toda ella fuente de inspiración y de prestigio grande, y, como secuela de la presencia de la Academia en Trujillo podemos decir con firmeza, fuerte y en voz alta: **PARA LOS QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DEL PERÚ, LA DESCENTRALIZACIÓN ESTÁ EN MARCHA.**



RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA

1. Publicaciones Periódicas

1.1. Anales de la Real Academia de Farmacia

Tomo I, Año 1932, n^{os} 1-4
Tomo II, Año 1933, n^{os} 1-4
Tomo III, Año 1934, n^{os} 1-4
Tomo IV, Año 1935, n^{os} 1-4
Tomo V, Año 1936, n^{os} 1-4
2^a Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, n^{os} 1-6
2^a Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, n^{os} 1-6
2^a Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, n^{os} 1-6
Año IX, 1943, n^{os} 1-6
Año X, 1944, n^{os} 1-6
Año XI, 1945, n^{os} 1-4
Año XII, 1946, n^{os} 1-4
Año XIII, 1947, n^{os} 1-6
Año XIV, 1948, n^{os} 1-6
Año XV, 1949, n^{os} 1,2,3,5 y 6
Año XVI, 1950, n^{os} 1-6
Año XVII, 1951, n^{os} 1-6
Año XVIII, 1952, n^{os} 1-6
Año XIX, 1953, n^{os} 1-6
Año XX, 1954, n^{os} 1-6
Año XXI, 1955, n^{os} 1-6
Año XXII, 1956, n^o 2
Año XXIII, 1957, n^o 4
Año XXIV, 1958, n^{os} 1-6
Año XXV, 1959, n^{os} 1-6
Volumen XXVI, Año 1960, n^{os} 2 y 3



Volumen XXVII, Año 1961, n^os 1-6
Volumen XXVIII, Año 1962, n^os 1-6
Volumen XXIX, Año 1963, n^os 1-6
Volumen XXX, Año 1964, n^os 1-6
Volumen XXXI, Año 1965, n^os 1-6
Volumen XXXII, Año 1966, n^os 1-6
Volumen XXXIII, Año 1967, n^os 1-4
Volumen XXXIV, Año 1968, n^os 1-4
Volumen XXXV, Año 1969, n^os 1-3
Volumen XXXVI, Año 1970, n^os 1-4
Volumen XXXVII, Año 1971, n^os 1-4
Volumen XXXVIII, Año 1972, n^os 1-4
Volumen XXXIX, Año 1973, n^os 1-4
Volumen XL, Año 1974, n^os 1-4
Volumen XLI, Año 1975, n^os 1-4
Volumen XLII, Año 1976, n^os 1-4
Volumen XLIII, Año 1977, n^o 2
Volumen XLIV, Año 1978, n^os 1 y 2
Volumen XLV, Año 1979, n^os 1-4
Volumen XLVI, Año 1980, n^os 1-4
Volumen XLVII, Año 1981, n^os 1-4
Volumen XLVIII, Año 1982, n^os 1-4
Volumen XLIX, Año 1983, n^os 1-4
Volumen L, Año 1984, n^os 1-4
Volumen LI, Año 1985, n^os 1-4
Volumen LII, Año 1986, n^os 1-4
Volumen LIII, Año 1987, n^os 1-4
Volumen LIV, Año 1988, n^os 1-4
Volumen LV, Año 1989, n^os 1-4
Volumen LVI, Año 1990, n^os 1-4
Volumen LVII, Año 1991, n^os 1-4
Volumen LVIII, Año 1992, n^os 1-4
Volumen LIX, Año 1993, n^os 1-4
Volumen LX, Año 1994, n^os 1-4 y apéndice
Volumen LXI, Año 1995, n^os 1-4 y apéndice



Volumen LXII, Año 1996, nºs 1-4
Volumen LXIII, año 1997, nº 1, 2, 3, 4
Volumen LXIV, año 1998, nº 1, 2, 3, 4
Volumen LXV, año 1999, nº 1,2,3,4 y extraordinario
Volumen LXVI, año 2000, nº 1,2,3,5
Volumen LXVII, año 2001, nº 1,2,3,4 y extraordinario
Volumen LXVIII, año 2002, nº 1,2,3,4 y extraordinario.
Volumen LXIX, año 2003, nº 1, 2, 3, 4

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado nº 2, Año 1977 Vol. XLIII; nºs 1 y 2, Año 1978 Vol. XLIII; nº extraordinario, Año 2002 Vol LXVIII.

1.2. Anuarios

- Anuario nº 1, Año 1948
- Anuario nº 2, Año 1949
- Anuario nº 3, Año 1950
- Anuario nº 4, Año 1951
- Anuario nº 5, Año 1952
- Anuario nº 6, Año 1953
- Anuario nº 7, Año 1954
- Anuario nº 8, Año 1955
- Anuario nº 9, Año 1956
- Anuario nº 10, Año 1957
- Anuario nº 11, Año 1958
- Anuario nº 12, Año 1959
- Anuario nº 13, Año 1960
- Anuario nº 14, Año 1961
- Anuario nº 15, Año 1962
- Anuario nº 16, Año 1963
- Anuario nº 17, Año 1964
- Anuario nº 18, Año 1965



- Anuario nº 19, Año 1966
- Anuario nº 20, Año 1967
- Anuario nº 21, Año 1968
- Anuario nº 22, Año 1969
- Anuario nº 23, Año 1970
- Anuario nº 24, Año 1971
- Anuario nº 25, Año 1972
- Anuario nº 26, Año 1973
- Anuario nº 27, Año 1974
- Anuario nº 28, Año 1975
- Anuario nº 29, Año 1976
- Anuario nº 30, Año 1977
- Anuario nº 31, Año 1978
- Anuario nº 32, Año 1979
- Anuario nº 33, Año 1980
- Anuario nº 34, Año 1981
- Anuario nº 35, Año 1982
- Anuario nº 36, Año 1983
- Anuario nº 37, Año 1984
- Anuario nº 38, Año 1985
- Anuario nº 39, Año 1986
- Anuario nº 40, Año 1987
- Anuario nº 41, Año 1988
- Anuario nº 42, Año 1989
- Anuario nº 43, Año 1990
- Anuario nº 44, Año 1991
- Anuario nº 45, Año 1992
- Anuario nº 46, Año 1993
- Anuario nº 47, Año 1995
- Anuario nº 48, Año 1996
- Anuario nº 49, Año 1997
- Anuario nº 50, Año 1998
- Anuario nº 51, Año 1999
- Anuario nº 52, Año 2000
- Anuario nº 53, Año 2001



- Anuario nº 54, Año 2002
- Anuario nº 55, Año 2003.

Agotados nºs 1 al 27 (1948-1974); nº 31 (1978); nº 33 (1980); nº 52 (1999).

2. Monografías

2.1. Monografías de Aguas Mineromedicinales

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975
Corconte (Agotada)	1976
Ledesma	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafort	1995
Hervideros de Cofrentes	1998



Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada	2002

2.2. *Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas*

- Diseño de Medicamentos. Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994. Coordinador: Dr. Arturo Mosqueira Toribio.
- Proliferación celular y cáncer. Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994. Coordinadores: Dra María Cascales y Dr. Julio Rodríguez Villanueva.
- Autoinmunidad Algunos aspectos básicos y clínicos. Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996. Coordinador: Dr. Antonio Portolés Alonso.
- Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Publicada en colaboración con la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.
- Los residuos y sus riesgos para la salud. Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJU FARMA, CAJA MADRID, Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 1.998. Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.
- Alimentos y Salud. 2000. Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.
- Salud, Educación y Energía Recursos cualificados para el Siglo XXI. Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2001. Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.
- Proliferación celular y cáncer 2000. Publicada en



- colaboración de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. 2001.
Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.
- Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca. 2001.
Coordinador: Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
 - La Salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre del 2001). 2002.
Coordinador: Dr. León Villanúa Fungairiño
 - Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento. 2003.
Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto, Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Dr. Pedro García Barreno.
 - Temas escogidos de Seguridad Alimentaria. 2003.
Coordinadores: Dr. Bernabé Sanz Pérez y Dr. Manuel Domínguez Carmona

2.3. Otras Monografías

- Sesión Científica en homenaje al Excmo. Sr. D. Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989. (Agotado).
- Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.
- Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.
- Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa. En prensa.



- Ayer y Hoy de las Academias. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El Genoma Humano Ciencia y Ética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Toxicología Ambiental. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Farmacocinética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patentes y Biopatentes. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Parasitismo y Desarrollo. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Patogenia de Iones Metálicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Uso actual de las plantas medicinales cultivadas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El uso ilegítimo de los agentes químicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- El SIDA Un reto a la Ciencia y a la Sociedad. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- Investigación y siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- Prescripción, Dispensación y Evidencia Científica (Medicina basada en la evidencia). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- Las especialidades Farmacéuticas Genéricas y los Precios de Referencia. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de amigos de la



- Real Academia de Farmacia.
- Genómica y Farmacogenómica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002
 - La Universidad de Hoy y los Farmacéuticos de mañana. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
 - Infección por VIH y SIDA. Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002
 - Farmacoeconomía e Investigación de Resultados en la Salud Principios y Práctica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación "José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia". 2002.
Coordinador: Dr. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Dr. Javier Soto Alvarez.
 - Sesión Extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera. Coordinador: Antonio Portolés Alonso. (separata del num. 2; Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia). 2002
 - Modificadores de la respuesta biológica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
 - Autocuidado de la Salud. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP) 2003.
 - Transferencias y coordinación farmacéutica. Publicada en



colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.

- Investigación y Siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.

3. Facsímiles

- Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica de Pedro Gutiérrez Bueno (Madrid, 1815). Prologado por la Dra M^a del Carmen Francés Causapé, 1994
- Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico, y medicinales virtudes. De Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por Dra. M^a del Carmen Francés Causapé, 1995.
- Concordia Aromatariorum Caesaraugstanensium DDLIII. Prologada por Dra. M^a del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
- Edición Facsímil de los Discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera. 2002
- Edición Facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Roldán y Guerrero. Tomo I. Presentación por Dr. D. Antonio Portolés Alonso y prologado por la Dra. M^a del Carmen Francés Causapé. 2003

4. Sesiones necrológicas

240



- Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle, 1992.
- Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo, 1992.
- Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
- Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. 1996.
- Excmo. Sr. D. Octavio Carpena Artés. 1997.
- Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. 1998.
- Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. 1998.
- Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. 2000.
- Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. 2000.
- Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. 2000.
- Excmo. Sr. D. Manuel Martel San Gil. 2001

5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso.

- La vida in vitro. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
- El alma de la Farmacia. Por el Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
- La contaminación del ambiente y su influencia en la vida. Por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
- Los medicamentos de ayer y de hoy. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1972.
- La Química médica ante el futuro. Por el Excmo. Sr. D. Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.
- La revolución farmacéutica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Jáuregui González. Año 1974.
- Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas. Por el Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.
- El problema de la creación de nuevos medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
- El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.



- Momentos estelares del pensamiento científico. Por el Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle. Año 1978.
- Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos. Por el Excmo. Sr. D. Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.
- La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
- Consideraciones históricas sobre la porcelana. Por el Excmo. Sr. D. Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
- Anecdótico microbiano. Por el Excmo. Sr. D. Lorenzo Vilas López. Año 1982.
- Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
- Técnica y Medio Ambiente. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
- Albaro Alonso Barba. Un metalurgo del siglo de Oro. Por el Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
- La ultracentrífuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular. Por el Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
- La Biosfera y el Hombre. Por el Excmo. Sr. D. Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
- Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico. Por el Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo. Año 1988.
- Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor. Por el Excmo. Sr. D. Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
- El grave peligro de pensar. Por el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana. Año 1990.
- La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López. Año 1991.
- Sistema Nervioso Central (SNC). Por el Excmo. Sr. D. Alfredo



- Carrato Ibáñez. Año 1992.
- El Universo del Medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. Año 1993.
 - Alimentación y cáncer. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata. Año 1994.
 - Legislación y Métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos. Por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.
 - Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega. Año 1996.
 - Impresiones sobre Severo Ochoa. Por el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
 - Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998
 - Farmacología de la Inflamación. Por el Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
 - Moléculas y Comunicación Biológica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ruiz Amil. 2000.
 - Supervivencia e Individualidad en Biología. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. Año 2001
 - Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos. Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto. Año 2002.
 - Terapéutica Farmacológica en el anciano. Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.

6. Otras publicaciones

- Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Roldán Guerrero.



- Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, Año 1975. Tomo IV, Año 1976.
- Código Deontológico Farmacéutico. Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
 - Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos. Año 1992.
 - Tríptico explicativo de "El Museo de la Real Academia de Farmacia". Año 1995.
 - Colección de tarjetas postales sobre el "Museo de la Real Academia de Farmacia". Por la Excma. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1998.
 - Jornada sobre Atención Farmacéutica. Año 1998.
 - Avances de la Ciencias a través del Premio Nobel. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
 - El Museo de la Real Academia de Farmacia. Por Excma. Sra. Dña. M^a Del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1999.
 - Historia de la Real Academia de Farmacia. por Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado anotado e ilustrado por la Excma. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé. Año 2002.



ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS

- Anemias hemolíticas- **Pág. 111**
Anticuerpos- **Pág. 289**
Anti-idiotipos- **Pág. 289**
Apetito- **Pág. 258, 289**
Balance energético- **Pág. 258, 289**
Biología-
Cadena epidemiológica-
Cadena epidemiológica.—
Mareas rojas.—
Dinoflagelados.—
Cafeína.—
Cáncer-
Células troncales adultas (AS)-
Células troncales embrionarias (ES)-
Clima y contaminación- **Pág. 157**
Columnas experimentales-
Concepto y ámbito de la Química Analítica-
Contaminantes- **Pág. 157**
Corneómetro- **Pág. 303**
Daño actínico- **Pág. 83**
Dinoflagelados-
Emulsión concentrada glucosa oxidasa-
Emulsión concentrada glucosa oxidasa.—
Enfermedad de Parkinson.—
Factores CREB.—
Envejecimiento-
Enzimopatía eritrocitos- **Pág. 111**
Erwin Schrödinger-
Estatuto del embrión humano-
Ésteres de α -hidroxiácidos- **Pág. 303**
Evolución de la Química Analítica-
Farmacia-
Farmacia Clínica- **Pág. 83**
Filtros solares- **Pág. 83**
Física-
Fotodermatosis- **Pág. 83**
Fotoprotectores- **Pág. 83**
Fuentes del Paseo del Prado- **Pág. 157**
Gasto energético- **Pág. 289**
Hidratación- **Pág. 303**
Hipotálamo- **Pág. 258**
Inestabilidad genómica-
Inmovilización en microgeles de poliacrilamida-
Inmovilización en microgeles de poliacrilamida.-
Inmunoterapia- **Pág. 289**
Intoxicación-
Intoxicación.—
Investigación epidemiológica de brotes
Investigación epidemiológica de brotes-
Irritación- **Pág. 303**
Julio Palacios-
Leptina- **Pág. 258**



Liberación oral controlada- **Pág. 146**
 Liebig- Pág.
 Lipodistrofia-
 Lixiviados-
 Mareas rojas-
 Mecanicismo-
 Medicina regenerativa-
 Metales pesados-
 Microcápsulas- **Pág. 146**
 Mutaciones PK- **Pág. 111**
 Naproxeno- **Pág. 146**
 Neuronas GABAérgicas.—
 Proteínas G.—
 Normativa europea-
 Nucleo estriado—
 Obesidad- **Pág. 289**
 Opiáceo dependientes- **Pág. 317**
 Parámetros antropométricos- **Pág. 317**
 Prevención-
 Prevención.—
 Programa de mantenimiento con metadona- **Pág. 317**
 Programa de vigilancia de biotoxinas marinas-
 Programa de vigilancia de biotoxinas marinas.—
 Publicaciones en Química Analítica-
 Receptores de adenosina.—
 Receptores de dopamina.-
 Red de alerta de mareas rojas-
 Red de alerta de mareas rojas.—
 Normativa europea.—
 Reduccionismo-

Severo Ochoa-
 Síndromes progeroides-
 Síntesis de microgeles-
 Síntesis de microgeles.—
 Tendencias en instrumentación analítica-
 Terapia celular-
 Toxinas diarreicas de los moluscos-
 Toxinas diarreicas de los moluscos.—
 α -hidroxiácido- **Pág. 303**



ÍNDICE DE AUTORES

- ALAN DE FANTI, B.;
MARTÍNEZ-ANSÓ, E.;
LAMAS LONGARELA, O.;
MILAGRO YOLDI, F.;
MARTÍNEZ HERNÁNDEZ,
J.A.- Inmuno-manipulación
del apetito y metabolismo.-
Pág. 289
- ALMEIDA, F.- Véase
FERREIRA, D.- **Pág. 145**
- ALONSO BEDATE, C.- Una
visión ontológica del embrión
humano: ¿Existen paradigmas
plurales?.- **Pág.**
- AMARAL, H.- Véase
FERREIRA, D.- **Pág. 145**
aspectos científicos y éticos.
Presentación- **Pág.**
- AVENDAÑO LÓPEZ, C.-
Relevancia de Liebig en el
desarrollo de la Química
Orgánica.- **Pág.**
- BAUTISTA SANTA CRUZ,
J.M.- Véase GARRIDO
PERTIERRA A.- **Pág. 111**
Bibliografía.- **Pág. 243, 245,**
343, 344, 345
- Bioquímica y Fisiopatología del
envejecimiento.- **Pág.**
- CASCALES ANGOSTO, M.-
Bases moleculares de la
apoptosis.- **Pág. 43**
- CASTILLO del B.- Véase
MARTÍN, M^a A.- **Pág.**
Células troncales humanas:
- CISTERNAS, J.- Véase COSTA,
E.- **Pág. 303**
- CORREA, O.- Véase COSTA,
E.- **Pág. 303**
- COSTA, E.; CORREA, O.;
ORLANDI, C.;
CISTERNAS, J.- Evaluación
del efecto irritante e
hidratante de ésteres de α -
hidroxiácidos.- **Pág. 303**
- CUEVAS SÁNCHEZ, P.-
Aplicación terapéutica de las
células troncales adultas y
embrionarias. ¿Mito o
realidad?. **Pág.**
- DÍAZ FLORES, J.F.- Véase
VERDE MÉNDEZ, C.M.-
Pág. 317
- DÍAZ ROMERO, C.- Véase
VERDE MÉNDEZ, C.M.-
Pág. 317
- FERREIRA, D.; ALMEIDA, F.;
AMARAL, H.; VEIGA, F.;
SOUSA LOBO, J.M.- De-
sign and development of oral
controlled release microcap-
sules containing naproxen.-
Pág. 145
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.-
Justus von Liebig: un
docente en química orgánica



- y su influencia en la Farmacia Española.- **Pág.**
- FREDHOLM, B. B.- Caffeine and the biological role of adenosine receptors.- **Pág.**
- GARCÍA BARRENO, P.- Bioquímica y Fisiopatología del envejecimiento: Genes Viejos. **Pág.**
- GARCÍA MENDOZA, C.- Bibliografía.- **Pág. 351**
- GARRIDO PERTIERRA, A.; BAUTISTA SANTA CRUZ, J.M.- Deficiencias en piruvato quinasa y anemias hemolíticas.- **Pág. 111**
- GESTAL OTERO, J. J.- Aspectos epidemiológicos de la intoxicación por toxina diarreaica de los moluscos (DSP).- **Pág.**
- GIRÁLDEZ, A.- Bibliografía.- **Págs. 240, Pág. 241, 347, 349, 353, 355**
- GONZÁLEZ DE POSADA, F.- La Farmacia: de la Física a la Biología. La existencia de "fantasmas".- **Pág.**
- GONZÁLEZ GONZÁLEZ, G.- Liebig: hito de la agronomía del siglo XIX.- **Pág.**
- GONZÁLEZ HUECAS, C., MORENO MERINO, L MARTÍN GÓMEZ, M^a C., LÓPEZ FERNÁNDEZ, G., LÓPEZ LAFUENTE, A.- Estudio de la influencia de los suelos contaminados por metales pesados en las aguas naturales.- **Pág.**
- JIMÉNEZ GALLEGO.- Métodos revolucionarios para el análisis de macromoléculas.- **Pág. 71**
- JIMÉNEZ GÓMEZ, S.- La química agrícola de Liebig: una forma de integración de conocimientos.- **Pág.**
- LACADENA CALERO, J.R.- Los Premios Nobel 2002 en Fisiología, Medicina y Química: Presentación de la Sesión Científica de la Real Academia Nacional de Farmacia (5 de diciembre de 2002).- **Pág. 27**
- LAMAS LONGARELA, O.- Véase ALAN DE FANTI, B.- **Pág. 289**
- LÓPEZ FERNÁNDEZ, G.- Véase GONZÁLEZ HUECAS, C.- **Pág.**
- LÓPEZ LAFUENTE, A.- Véase GONZÁLEZ HUECAS, C.- **Pág.**
- LÓPEZ MORATALLA, N.- La racionalidad terapéutica en la Medicina regenerativa con células troncales

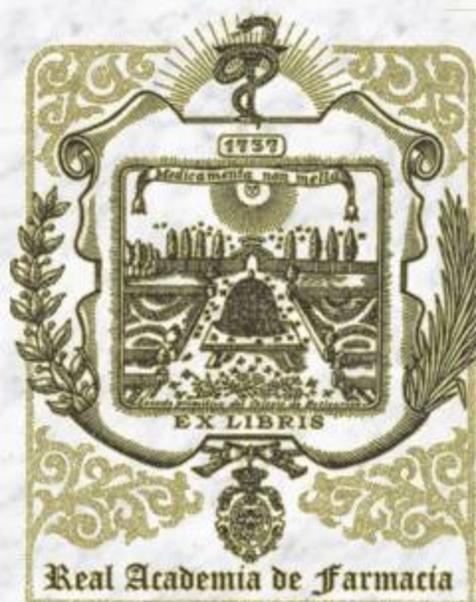


- embrionarias o de adulto-
Pág.
- LÓPEZ-CABARCOS, E.- Véase
RUBIO RETAMA, J.- **Pág.**
- LÓPEZ-RUIZ, B.- Véase RU-
BIO RETAMA, J.- **Pág.**
- MARTÍN GÓMEZ, M^a C.-
Véase GONZÁLEZ
HUECAS, C.- **Pág.**
- MARTÍN, M^a A., OLIVES, A.
I., CASTILLO del, B.,
MENÉNDEZ, J.C.- La
Química Analítica: aspectos
conceptuales y docentes.
Evolución, perspectivas
actuales y retos de futuro.-
Pág.
- MARTÍNEZ HERNÁNDEZ,
J.A.- Véase ALAN DE
FANTI, B.- **Pág. 289**
- MARTÍNEZ-ANSÓ, E.- Véase
ALAN DE FANTI, B.- **Pág.**
289
- MENÉNDEZ J.C.- Véase
MARTÍN, M^a A.- **Pág**
- MILAGRO YOLDI, F.- Véase
ALAN DE FANTI, B.- **Pág.**
289
- MORENO MERINO, L.- Véase
GONZÁLEZ HUECAS, C.-
Pág.
- MURO BENAYAS, S.-
Urbanismo y Salud Pública
en el espacio urbano (II).-
Pág. 157
- OLIVES, A. I., Véase
MARTÍN, M^a A.- **Pág.**
- ORLANDI, C.- Véase COSTA,
E.- **Pág. 303**
- PASCUAL-LEONE PASCUAL,
A. M.- Balance energético:
Leptina.- **Pág. 257**
- PORTOLÉS ALONSO, A.-
Sesión Extraordinaria
conmemorativa del
Bicentenario del nacimiento
de JUSTUS VON LIEBIG
(1803-1873): Apertura.-
Pág.
- PORTOLÉS ALONSO.-
Bibliografía.- **Pág. 248**
- PRIMO YÚFERA, E.- Nuevas
tendencias en la lucha
ecológica contra insectos. El
caso de la *Ceratitis*
Capitata.- **Pág. 5**
- RAMÍREZ ORTEGA, A.-
Bibliografía.- **Pág. 242**
- REOL TEJADA, J.M.- Clausura
de la Sesión conmemorativa
del Bicentenario del
nacimiento de Justus von
Liebig.- **Pág.**
- RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ,
E.M.- Véase VERDE
MÉNDEZ, C.M.- **Pág. 317**
- RUBIO RETAMA, J., LÓPEZ-
CABARCOS, E., LÓPEZ-



- RUIZ, B.- Optimiza-ción de la inmovilización de glucosa oxidasa en microgeles de poliacrilamida.- **Pág.**
- SANTOS de los
CARVALLIDO, C.-
Farmacia clínica del daño
actínico. Evolución
conceptual en la prevención
y tratamiento de la
fotodermatitis. Presente y
futuro.- **Pág. 81**
- SANZ PÉREZ, B.- Aportaciones
del Barón Justus von Liebig
a la Nutrición.- **Pág.**
- SAÑUDO, R.I.- Véase VERDE
MÉNDEZ, C.M.- **Pág. 317**
- SOUSA LOBO, J.M.- Véase
FERREIRA, D.- **Pág. 145**
- VEIGA, F.- Véase FERREIRA,
D.- **Pág. 145**
- VERDE MÉNDEZ, C.M.; DÍAZ
FLORES, J.F.; SAÑUDO,
R.I.; RODRÍGUEZ
RODRÍGUEZ, E.M.; DÍAZ
ROMERO, C.- Parámetros
antropométricos en pacientes
opiáceodependientes
incluidos en un programa de
mantenimiento con
metadona.- **Pág. 317**
- VICENTE de JORDANA, R.-
Discurso de contestación al
de D. Eduardo Primo
Yúfera.- **Pág. 11**
- WOLF-DIETER MÜLLER-
JAHNCKE CHRISTOPH
FRIEDRICH.- Liebig et la
Pharmacy.- **Pág.**
- AMIEL PÉREZ, J.- V Congreso
Nacional de Ciencias
Farmacéuticas: Discurso
Inaugural
- MONGE, A.- Bibliografía.- **Pág.**
- SELLÉS, E.- Bibliografía.- **Pág.**
- GARCÍA MENDOZA, C.-
Bibliografía.- **Pág.**
- SAN MARTÍN BACAICOA.-
J.- Noticias.- **Pág. 235**





MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com