

Laboratorio de Fisiología animal. Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Acción de algunos compuestos de amonio cuaternario sobre la absorción de glucosa por la levadura*

Ramón Parés-Farrás**

(Recibido para publicar el 19 de junio de 1956)

Introducción

Los compuestos de amonio cuaternario de elevado peso molecular constituyen un grupo de sustancias muy estudiadas, sobre todo desde el punto de vista de sus propiedades germicidas. No obstante, su modo de acción sobre la célula de los microorganismos está todavía lejos de poder considerarse resuelta.

COWLES (11) estudió la actividad germicida de varias series homólogas de alcoholes. Observó que el poder germicida sobre *Eberthella typhosa* y *S. aureus* aumenta a medida que se incrementa la longitud de la cadena de carbonos y a medida que crece la actividad capilar. De los datos obtenidos, COWLES sugiere que los germicidas orgánicos dotados de actividad superficial deben de actuar primariamente por adsorción sobre la superficie de los microorganismos.

ANSON (4) ha señalado que las sustancias tensoactivas deben destruir la semipermeabilidad de la membrana celular. Se han establecido correlaciones entre actividad capilar y poder germicida para una gran variedad de sustancias (30, 33, 36, 58). La acción germicida de los compuestos de amonio cua-

* Parte de la Memoria doctoral leída en la Facultad de Ciencias en marzo de 1956.

** Con una beca del Patronato Juan de la Cierva.

ternario también debería guardar relación con su elevada tensoactividad. Esta propiedad determinará la fijación de una considerable cantidad de compuesto tensoactivo sobre la superficie de las bacterias (33, 58). RAHN (41) obtuvo resultados que confirman el hecho de la fuerte adsorbabilidad de los compuestos de amonio cuaternario.

LAMANNA y CAMPBELL (30) encuentran una pronunciada correlación entre actividad capilar e inhibición del consumo de oxígeno por células de levadura para el uretano y el cloruro de cetil-piridinio.

Frente a la gran actividad germicida de los compuestos de amonio cuaternario, se ha contrapuesto el hecho de la elevada efectividad de otros compuestos catiónicos con muy poca acción capilar, tales como iones mercurícos o colorantes. También se ha señalado que la tensión superficial realmente importante sería la de la interfase agua/membrana celular y no la de la interfase agua/aire, que es a la que se refieren las medidas ordinarias (33).

ALBERT (1) atribuye la acción de los antisépticos catiónicos a sus iones básicos que reaccionarían con los iones ácidos del protoplasma de los microorganismos. Igualmente señala que estos compuestos tienen mayor efecto sobre los organismos que contienen más grupos ácidos que básicos. Estos hechos permitirían explicar la selectividad de los compuestos de amonio cuaternario sobre las bacterias Gram positivas.

Por otra parte, desde los antiguos trabajos de JACOBS (25), se ha venido insistiendo repetidamente en la importancia de la estructura molecular para la actividad biológica de los germicidas de amonio cuaternario. En un interesante estudio, RAWLINS, SWEET y JOSLYN (42) consiguen establecer que la actividad germicida de un compuesto de amonio cuaternario no sólo está determinada por su configuración general, sino que también es muy influida por pequeñas variaciones en la naturaleza química de cada uno de los radicales incluidos en su molécula. De este modo, por ejemplo, fijaron la gran importancia del grupo bencilo en el núcleo molecular.

Existen diversos datos que inducen a pensar que los compuestos de amonio cuaternario penetran dentro de la célula. DYAR (15) y DYAR y ORDAL (14) llegan a esta conclusión después de estudiar varias propiedades tintoriales y la movilidad electroforética de bacterias tratadas con compuestos tensoactivos aniónicos y catiónicos. El tetradecil sulfato de sodio no produjo modificación en esta última propiedad. En cambio, el cloruro de cetil piridinio produjo una disminución de la carga de las células. Prosiguiendo estos trabajos, KIVELA, MALLMANN y CHURCHILL (26, 27) observaron que la carga eléctrica nor-

mal de las células bacterianas puede ser restablecida por lavado. Sin embargo, los organismos no pueden ser reanimados. Posteriormente, KLEIN y KARDON (28) también afirmaron que era imposible hacer revivir bacterias previamente tratadas por encima de cierto nivel de concentración de un compuesto de amonio cuaternario.

En una serie de publicaciones, MILLER, BAKER y HARRISON (5, 6, 7, 34, 35) determinaron los efectos de los germicidas de amonio cuaternario y de otros detergentes sintéticos sobre el metabolismo bacteriano. En estos estudios, suspensiones lavadas de microorganismos fueron colocadas en apropiados tampones conteniendo glucosa 0,02 M. Luego, con el método de WARBURG, se midió la velocidad de respiración y la de fermentación. En su primera publicación (34) se señala que el cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio ejerce una pronunciada acción inhibitoria tanto sobre la respiración como sobre la glucólisis en la flora microbiana asociada a la caries dental. En ésta se incluyen lactobacilos, dos cepas de *Micrococcus tetragenus*, *S. albus*, un diplococo aeróbico productor de ácido, Gram positivo, no identificado y una levadura del género *Monilia*. La actividad metabólica no se recuperaba lavando con solución fisiológica la suspensión de células tratada y centrifugada.

En las últimas publicaciones (5, 6, 35), los referidos autores describen la acción de una gran variedad de detergentes sintéticos sobre el metabolismo bacteriano. Todos los compuestos de amonio cuaternario se mostraron efectivos, inhibiendo el metabolismo desde concentraciones muy bajas.

BAKER, HARRISON y MILLER (5), como consecuencia de sus estudios, sugieren que la completa ausencia de acción bactericida de los detergentes aniónicos y la disminuida actividad de los detergentes catiónicos sobre los organismos Gram negativos podrían ser relacionadas con la diferencia en contenido o tipo de fosfolípidos celulares. Además, demostraron que el cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio y el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio, ambos conteniendo un grupo bencilo en el núcleo, fueron más activos contra las bacterias que los detergentes catiónicos sin dicho grupo bencilo.

En uno de los trabajos referidos (7) se estudia la interferencia de los fosfolípidos sobre la acción antibacteriana de los detergentes sintéticos. La acción protectora de los fosfolípidos únicamente tiene lugar cuando son añadidos antes o simultáneamente con los detergentes. Esto se diferencia de la reversibilidad producida por los agentes aniónicos. En consecuencia, los autores concluyen que los dos tipos de interferencia son completamente distintos.

SEVAG y ROSS (53) investigaron la inhibición del metabolismo de la levadura por el cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio. Por medidas manométricas, encontraron que dicho compuesto inhibe la degradación aeróbica y anaeróbica de la glucosa.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que los detergentes catiónicos y aniónicos inhiben la acción de enzimas aisladas. WILLS (56) encuentra inhibición de la ureasa y de la lipasa pancreática por el taurocolato sódico, el alquil sulfato de sodio y la suramina.

En experiencias con *Eberthella typhosa*, ORDAL y BORG (37) encuentran que se requiere concentraciones mucho menores de cloruro de cetil piridinio para inhibir la oxidación del lactato con oxígeno molecular que con el azul de metileno. Este hecho les condujo a admitir que el sistema citocromo posee en este caso una sensibilidad particular a los agentes tensoactivos. Para el cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio, SEVAG y ROSS (53) pusieron de manifiesto que concentraciones del orden de 1:10.000 o mayores causan una pronunciada disminución o anulan las bandas de absorción de una preparación de citocromo C de levadura.

KUHN y BIELIG (29) estudiaron el efecto del bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio sobre varias vatalasas, provitamina A, cloroplastina, albúmina, suero y otras proteínas. Encontraron efectos positivos y variables según el punto isoelectrico de la proteína y el pH del medio.

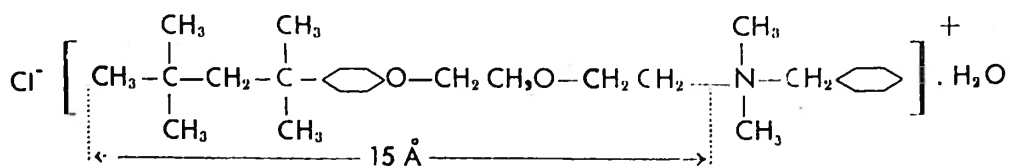
En el presente trabajo se estudia el modo de acción de varios compuestos de amonio cuaternario sobre las células de levadura en relación con el transporte de glucosa a través de la membrana y su ulterior consumo en el interior de la célula.

Material y métodos

COMPUESTOS UTILIZADOS

Se han empleado cuatro compuestos de amonio cuaternario:

1. Cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio (42).

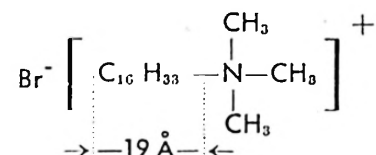


Peso molecular : 465.5.

Sólido, cristalino, blanco.

Iomh & Haas Co.

2. Bromuro de cetil-trimetil-amonio (23).

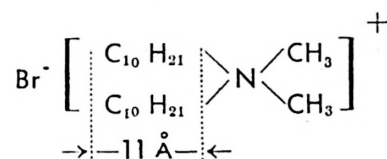


Peso molecular : 364.

Polvo voluminoso de color crema pálido. Lleva alguna proporción de sales inorgánicas no identificadas.

Imperial Chemical (Pharmaceutical) Ltd.

3. Bromuro de didecil-dimetil-amonio (43).



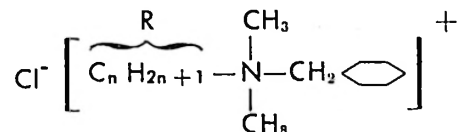
Peso molecular : 406.

Solución oleosa concentrada.

British Hydrological Corporation.

4. Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio (13).

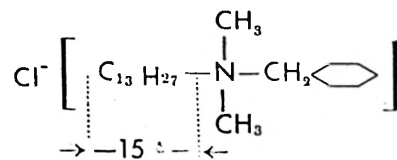
Es una mezcla de compuestos del tipo



en los que *R* es un radical alquílico con un número de átomos de carbono variable entre 8 y 18. Sobre peso seco de compuesto, el porcentaje de cada uno de ellos es :

$\text{C}_8 - \text{C}_{10}$	10 %
C_{12}	50 %
C_{14}	25 %
$\text{C}_{16} - \text{C}_{18}$	15 %

Peso molecular medio 353,5, calculado sobre la fórmula



Solución acuosa.

Winthrop - Stearns, Inc.

Las propiedades germicidas de estos compuestos son bien conocidas. En el cuadro I se recogen algunos de los valores de los coeficientes fenol correspondientes para *S. aureus*.

CUADRO I

Actividad germicida de los compuestos de amonio cuaternario utilizados

Compuesto	Coficiente fenol a 20° C. sobre <i>S. aureus</i>	Autor
Cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxil-etil-dimetil-bencil-amonio	323	LAWRENCE (33)
Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio	250	LAWRENCE (31) (32)
Bromuro de didecil-dimetil-amonio	330	RESSUGGAN (43)
Bromuro de cetil-trimetil-amonio	300	HOOGERHEIDE (23)

TITULACIÓN

En los ensayos verificados se ha partido de productos comerciales. Para fijar con seguridad su riqueza en materia activa, se ha tenido que proceder a su titulación.

Con los datos suministrados por las firmas productoras se han preparado soluciones de una concentración aproximada del 1 por mil. Sobre estas soluciones se ha llevado a cabo la determinación del contenido en amonio cuaternario.

Se han ensayado los procedimientos de HARTLEY-RUNNICES (21) y de EPTON (16), adoptándose este último por proporcionar un final de titulación más definido. Según EPTON,

para las concentraciones empleadas, el error que puede cometerse en la titulación no sobrepasa el 1 %. Este error se ha considerado completamente despreciable para la finalidad perseguida en este trabajo.

Procedimiento seguido :

I. Reactivos :

Solución A

Azul de metileno . . .	0,003	%
Acido sulfúrico . . .	1,2	%
Sulfato sódico anhidro. .	5,0	%

Solución B

Lauril sulfato de sodio 0,002 M.

Se ha partido de un lauril sulfato de sodio cristalizado y purísimo ($C_{12}H_{25}SO_4Na$, P. M. 288), fabricado por la firma Esperis, S. A., de Milán.

Cloroformo (calidad reactivo).

II. Operaciones :

En un tubo de 100 ml. con tapón esmerilado se introducen 25 ml de solución A. Se añaden 10 ml. de solución B y 15 de cloroformo.

Se agita. Por reposo se separan dos fases : la clorofórmica, azul, y la acuosa, incolora.

CUADRO II

Titulación de las soluciones empleadas de los compuestos de amonio cuaternario

Compuesto	ml. gastados de solución 1 por 1.000	M.	%.
Cloruro monohidratado de di-iso- butil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil- amonio	8,4	0,0024	1,117
Bromuro de cetil-trimetil-amonio	7,7	0,0026	0,946
Bromuro de didecil-dimetil-amonio	6,5	0,0031	1,259
Cloruro de alquil-dimetil-bencil- amonio	6,45	0,0031	1,096

Mediante una bureta, se va añadiendo paulatinamente la solución a titular. Intermitentemente, se agita y se deja reposar. Se prosigue cuidadosamente hasta que las dos fases muestren una coloración azul igualmente intensa por reflexión.

Según EPTON, en el punto final de la reacción el complejo anión-catión activos se ha formado cuantitativamente. Por tanto, se verificará :

$$10 \times 0,002 = n \cdot x$$

siendo n el número de mililitros de solución de amonio cuaternario gastados y x la molaridad de la misma.

En el cuadro II se expresan las concentraciones obtenidas para cada una de las soluciones.

Las molaridades de las soluciones empleadas en las experiencias se han calculado teniendo en cuenta estas valoraciones.

CUADRO III

Tensión superficial absoluta a 19° C. de las soluciones 0.002 M. de los compuestos de amonio cuaternario

Compuesto	Tensión superficial
Cloruro monohidratado de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio	46,5 dinas/cm.
Bromuro de didecil-dimetil-amonio	39,0 dinas/cm.
Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio	45,5 dinas/cm.
Bromuro de cetil-trimetil-amonio	52,1 dinas/cm.
Agua destilada	73,6 dinas/cm.

ACTIVIDAD CAPILAR

Se han preparado soluciones 0,002 M. de los cuatro compuestos de amonio cuaternario. Su tensión superficial absoluta a 19° C. ha sido determinada por el método de Lecompte Du-Noüy, utilizando la microbalanza de torsión de Bang con la pieza auxiliar de Brinkman.

En el cuadro III se exponen los resultados obtenidos.

FORMACIÓN DE MICELAS

Investigaciones osmóticas y conductimétricas llevadas a cabo sobre soluciones diluídas de lauril sulfato de sodio, han puesto

de manifiesto que las moléculas de esta sustancia pueden hallarse en solución bajo la forma de iones libres y de micelas (20, 56). En las soluciones diluídas, la forma iónica es predominante, mientras que en las soluciones concentradas abunda más la forma micelar. El cambio de uno a otro tipo de solución no es gradual, sino que tiene lugar bruscamente en una estrecha zona crítica de concentración.

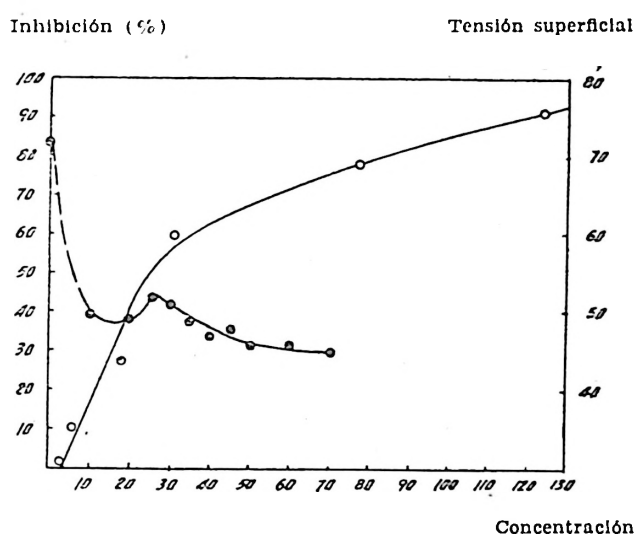


Figura 1
Bromuro de didecil-dimetil-amonio. Inhibición de la utilización de glucosa exterior y diagrama de tensión superficial.

Algunos compuestos de amonio cuaternario presentan diagramas de tensión superficial continuos. Sin embargo, se presentan con frecuencia ciertos casos anómalos. Dentro de las sustancias estudiadas por nosotros, el bromuro de didecil-dimetil-amonio muestra una brusca discontinuidad en la pendiente de la curva de tensión superficial para cierto nivel de concentración (cuadro IV y fig. 1).

Los diagramas anómalos de tensión superficial como el del bromuro de didecil-dimetil-amonio, se han explicado por la formación de micelas (2, 3, 10). El equilibrio entre el soluto concentrado en la superficie y el del interior de la solución se modifica como consecuencia de este fenómeno.

CUADRO IV

Tensión superficial de soluciones acuosas de bromuro de didecil-dimetil-amonio a 28° C

Concentración	Tensión superficial (promedio de 10 medidas)
10×10^{-5} M.	53,28 dinas/cm.
15×10^{-5} M.	—
20×10^{-5} M.	52,40 dinas/cm.
25×10^{-5} M.	56,00 dinas/cm.
30×10^{-5} M.	54,40 dinas/cm.
35×10^{-5} M.	52,40 dinas/cm.
40×10^{-5} M.	49,60 dinas/cm.
45×10^{-5} M.	51,20 dinas/cm.
50×10^{-5} M.	48,40 dinas/cm.
55×10^{-5} M.	—
60×10^{-5} M.	48,00 dinas/cm.
65×10^{-5} M.	—
70×10^{-5} M.	46,80 dinas/cm.

Como la formación de micelas tiene lugar entre estrechos márgenes de concentración, puede considerarse en primera aproximación que por encima de un determinado valor crítico, la concentración verdadera será :

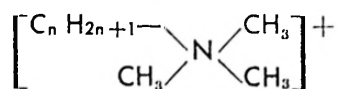
$$C = C_0 \left[1 + \gamma \left(\frac{1}{z} - 1 \right) \right]$$

siendo c_0 la concentración en iones libre, z el número de iones que constituyen cada micela y γ la fracción

$$\frac{\text{número de iones en las micelas}}{\text{número total de iones}}$$

La formación de micelas a partir de iones o de moléculas libres tendrá lugar, probablemente, por la simultánea intervención de dos tipos de fuerzas: *a*) atracción mutua entre las cadenas parafínicas y *b*) atracción entre las moléculas de agua y los extremos fuertemente polares del soluto tensoactivo.

La atracción entre los grupos apolares aumenta con el grado de lipofilia de los mismos. Así, por ejemplo, la tendencia a formar micelas de un tensoactivo del tipo.



se verá favorecida por el aumento de la longitud de la cadena parafínica lateral. Esta cohesión entre los grupos apolares es sensible a la temperatura (19, 22), y al descender ésta se facilita la formación de micelas (2).

La atracción entre grupos polares es más energética y poco sensible a los cambios de temperatura (19, 22). La estabilidad de las micelas dependerá particularmente de la envuelta de hidratación originada por la intervención de estas fuerzas.

El grado de hidratación de las micelas podrá, en cambio, ser influido por la presencia de iones inorgánicos en la solución. El efecto de un ión determinado dependerá de su propio grado de hidratación, el cual crece en razón inversa de su radio y en razón directa de su carga (19, 22).

Además de los iones inorgánicos también pueden influir sobre el grado de hidratación de las micelas sustancias orgánicas con grupos hidroxilo y amino (2).

CUADRO V

Efecto del ClNa (0,18 mols/l. de Cl^-) sobre la acción capilar del bromuro de didecil-dimetil-amonio a 28° C.

Concentración	Tensión superficial (promedio de 10 medidas)
10×10^{-5} M.	50,20 dinas/cm.
15×10^{-5} M.	—
20×10^{-5} M.	45,60 dinas/cm.
25×10^{-5} M.	45,70 dinas/cm.
30×10^{-5} M.	45,20 dinas/cm.
35×10^{-5} M.	44,40 dinas/cm.
40×10^{-5} M.	46,00 dinas/cm.
45×10^{-5} M.	44,20 dinas/cm.
50×10^{-5} M.	44,50 dinas/cm.
55×10^{-5} M.	44,50 dinas/cm.
60×10^{-5} M.	—
65×10^{-5} M.	44,50 dinas/cm.
70×10^{-5} M.	44,00 dinas/cm.

REICHENBERG (9) encontró que la inflexión de ciertos diagramas de tensión superficial desaparecía cuando la sustancia tensoactiva se purificaba debidamente. Esto indujo a suponer a varios autores que sólo los productos impuros daban lugar a las referidas curvas anómalas (8, 9). Es completamente plausible que impurezas orgánicas o inorgánicas puedan afectar el valor de γ y con ello modificar la curva de tensión superficial. Sin embargo, la formación de micelas es un hecho que puede tener lugar con completa independencia.

CUADRO VI

Efecto del Cl_2Ca (0,18 mols/l. de Cl^-) sobre la acción capilar del bromuro de didecil-dimetil-amonio a 28° C

Concentración	Tensión superficial (promedio de 10 medidas)
10×10^{-5} M.	50,00 dinas/cm.
15×10^{-5} M.	48,80 dinas/cm.
20×10^{-5} M.	50,80 dinas/cm.
25×10^{-5} M.	48,20 dinas/cm.
30×10^{-5} M.	46,20 dinas/cm.
35×10^{-5} M.	46,20 dinas/cm.
40×10^{-5} M.	46,40 dinas/cm.
45×10^{-5} M.	—
50×10^{-5} M.	45,90 dinas/cm.
55×10^{-5} M.	—
60×10^{-5} M.	44,90 dinas/cm.
65×10^{-5} M.	—
70×10^{-5} M.	44,80 dinas/cm.

De acuerdo con los datos consignados, podemos esperar poder impedir la formación de micelas añadiendo a la solución de tensoactivo sales inorgánicas apropiadas, sobre todo teniendo en cuenta que la atracción entre los grupos apolares debe de representar para la estabilidad de la micela un factor despreciable frente a la hidratación.

CUADRO VII

Efecto del Cl_2Fe (0,18 me. /l. de Cl^-) sobre la acción capilar del bromuro de didecil-dimetil-amonio a 28° C

Concentración	Tensión superficial (promedio de 10 medidas)
10×10^{-5} M.	51,20 dinas/cm.
15×10^{-5} M.	48,40 dinas/cm.
20×10^{-5} M.	48,80 dinas/cm.
25×10^{-5} M.	46,80 dinas/cm.
30×10^{-5} M.	45,20 dinas/cm.
35×10^{-5} M.	45,60 dinas/cm.
40×10^{-5} M.	44,80 dinas/cm.
45×10^{-5} M.	—
50×10^{-5} M.	45,20 dinas/cm.
55×10^{-5} M.	—
60×10^{-5} M.	44,80 dinas/cm.
65×10^{-5} M.	—
70×10^{-5} M.	46,00 dinas/cm.

En los cuadros V, VI y VII y en la figura 2 se consigna el efecto de varios cloruros inorgánicos sobre la acción capilar del bromuro de didecil-dimetil-amonio. Los resultados obtenidos están de acuerdo con la previsión teórica y establecen que la inflexión de la curva de tensión superficial de este compuesto de amonio cuaternario puede ser suprimida añadiendo a la solución cloruro sódico al 1 %.

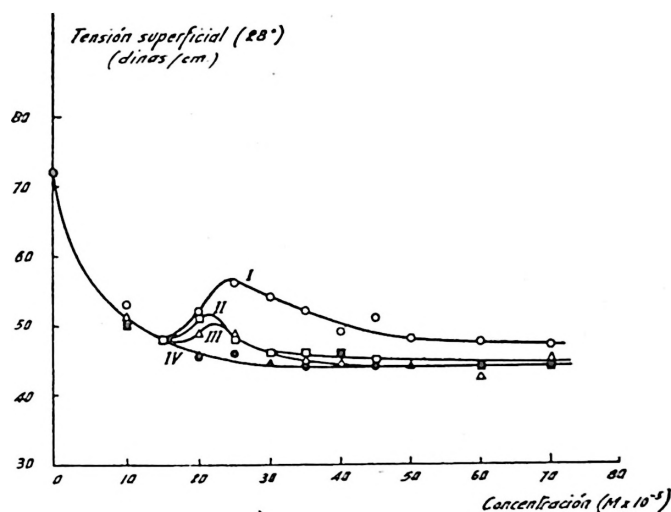


Figura 2
Efecto de varios cloruros inorgánicos sobre la acción capilar del bromuro de didecil-dimetil-amonio.
I. Tensioactivo. II. Tensioactivo + Cl_2Ca ($1,8 \cdot 10^{-1}$ M/l. de Cl^{-}) (x)

INHIBICIÓN DE LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA

Se ha utilizado levadura fresca de pan (*Saccharomyces cerevisiae*). Para las medidas de absorción de glucosa se ha seguido fundamentalmente el procedimiento empleado por ROTHSTEIN y LARRABEE (45). El período de vaciado de reservas se lleva a cabo en agua destilada y con aireación durante tres o cuatro horas. El pH de las suspensiones se ajusta con ClH 0,1 N. a 3,5, inmediatamente antes de la absorción. Después de 30 minutos de absorción se centrifuga y se determina la glucosa en el sobrenadante fotolorimétricamente con el reactivo de FOLIN-WU (38, 39).

En un trabajo anterior (39) ya dimos a conocer el efecto del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio sobre la absorción de glucosa por la levadura. En los cuadros VIII, IX y X y en las figs. 3, 4 y 5, se consignan los resultados obtenidos para los otros tres compuestos de amonio

CUADRO VIII

Acción del cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura

Concentración de inhibidor	ml. de glucosa absorbidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
3×10^{-5} M.	22	24	—
	21	22	—
	Media 21,5	23	—
8×10^{-5} M.	21	19	10
	22	15	32
	Media 21,5	17	21
14×10^{-5} M.	10	4	60
	10	4	60
	Media 10	4	60
24×10^{-5} M.	22	2	90
	21	2	90
	Media 21,5	2	90
37×10^{-5} M.	10	0	—
	10	0	100
	Media 10	0	—

cuaternario. Todos ellos ponen de manifiesto una gran actividad inhibidora de la utilización de glucosa exterior por la levadura para concentraciones muy inferiores a las que destruyen las membranas celulares (33). La inhibición crece muy rápidamente y casi de un modo lineal con el aumento de concentración de inhibidor, a excepción del bromuro de didecil-dimetil-amonio. En este último caso la inhibición no crece proporcionalmente con la concentración (fig. 5); para ciertos valores de la misma se presenta un cambio muy pronunciado en la relación entre el grado de inhibición y la concentración de inhibidor.

CUADRO IX

Acción del bromuro de cetil-trimetil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura

Concentración de inhibidor	mg de glucosa absorbidos en 1 2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
25×10^{-5} M.	22	21	5
	23	21	9
	21	21	0
	Media 22	21	5
30×10^{-5} M.	19	15	21
	20	15	25
	20	16	20
	Media 20	15	22
$38,5 \times 10^{-5}$ M.	22	14	36
	22	13	40
	Media 22	13,5	38
44×10^{-5} M.	21	11	48
	23	13	43
	Media 22	12	46
$49,5 \times 10^{-5}$ M.	22	10	55
	22	10	55
	23	10	56,5
	Media 22,5	10	55,5
69×10^{-5} M.	24	7	71
	23	6	83
	Media 23,5	6	83

INHIBICIÓN ANÓMALA

Como ya se ha señalado, la inhibición de la absorción de glucosa por el bromuro de didecil-dimetil-amonio difiere de la que se obtiene con los otros compuestos. Anomalías parecidas se han encontrado en otras sustancias tensoactivas como el uretano (17, 18, 30) y el cloruro de cetil piridinio (30).

CUADRO X

Acción del bromuro de didecil-dimetil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
3×10^{-3} M.	22	23	4
	22	22	0
	Media 22	22.5	2
6×10^{-3} M.	21	23	9
	20	23	13
	Media 20.5	23	11
18×10^{-3} M.	16	23	30
	17	23	26
	Media 16.5	23	28
31×10^{-3} M.	9	23	60
	—	22	—
	Media 9	22.5	60
77×10^{-3} M.	5	22	77
	5	23	80
	Media 5	22.5	78
124×10^{-3} M.	2	23	91
	—	23	—
	Media 2	23	91

FISHER y STERN (17) y FISHER y HENRY (18) consideraron que estas anomalías eran el resultado de la intervención de dos sistemas independientes, de acción fisiológica paralela y desigualmente sensibles al inhibidor. Posteriormente, LAMANNA y CAMPBELL (30) sugirieron que esta interpretación, probablemente, no sería correcta por el hecho de que las referidas

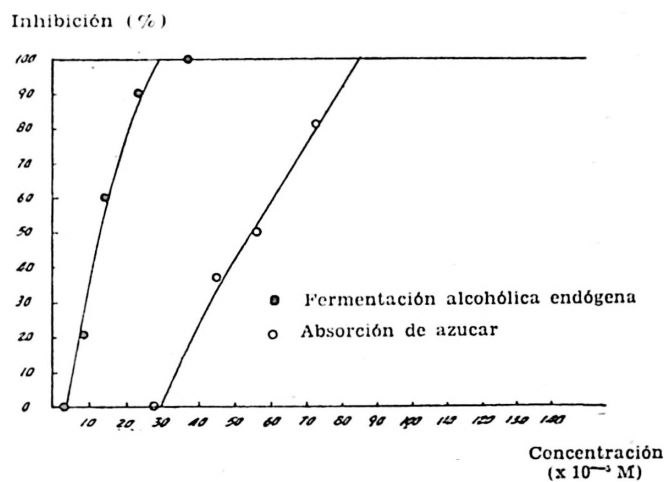


Figura 3

Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio.

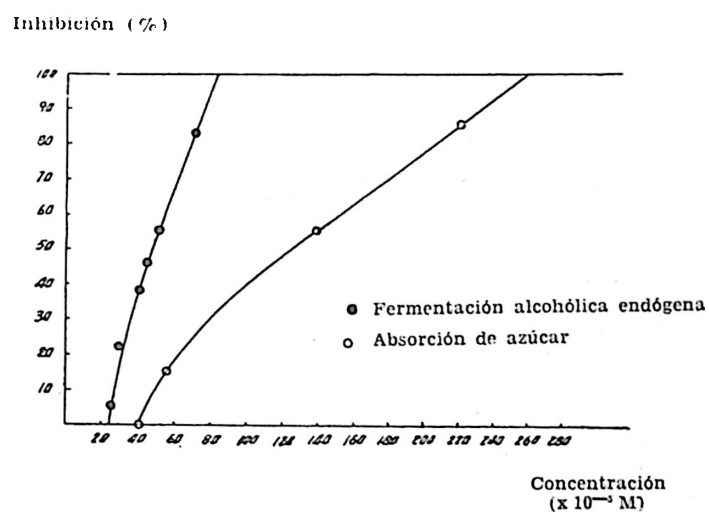


Figura 4

Bromuro de cetil-trimetil-amonio

anomalías en las curvas de inhibición parecían constituir una réplica a ciertas características particulares de las propiedades tensoactivas del inhibidor. Los referidos autores (30) pusieron

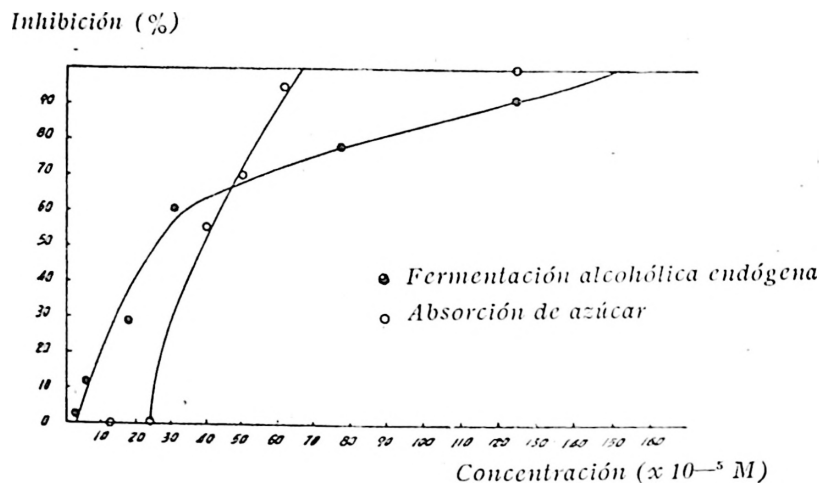


Figura 5

Bromuro de didecil-dimetil-amonio

de manifiesto que la curva de tensión superficial del uretano presenta bruscos cambios de pendiente al mismo nivel de concentración en el que se presentan las anomalías de la inhibición de la respiración de la levadura. También se señala un fenómeno análogo en la inhibición de la respiración de la levadura por el cloruro de cetil piridino (30). Como puede observarse en la fig. 1, el bromuro de didecil-dimetil-amonio presenta con relación a su efecto inhibitor sobre la absorción de glucosa unas características completamente análogas.

LAMANNA y CAMPBELL (30) sugirieron que al nivel de concentración en el cual se encontraban las anomalías de las curvas de inhibición y de tensión superficial tenía lugar la formación de micelas a partir de los iones o moléculas libres. La hipótesis de los referidos autores resulta extraordinariamente sugestiva pero, como señala DANIELLI (12), su completa aceptación requiere de otras pruebas además de la simple coincidencia entre las anomalías de las dos curvas.

Después de haber puesto de manifiesto que las anomalías en los diagramas de tensión superficial pueden suprimirse por la acción de iones inorgánicos, se nos sugirió la posibilidad de que por acción de los mismos iones también desapareciese la discontinuidad de la pendiente de la curva de inhibición. Como se señala en el cuadro XI, el bromuro de didecil-dimetil-amonio en presencia de cloruro sódico al 1 % muestra un comportamiento completamente normal (fig. 6), esto es, análogo al de los otros compuestos con diagrama de tipo aproximadamente lineal. Como a esta concentración el cloruro sódico es totalmen-

CUADRO XI

Acción del bromuro de didecil-dimetil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior por la levadura y en presencia de CNa al 1 %

Concentración de inhibidor	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
20×10^{-5} M.	23.5	7.6	69
	24	7.1	70.4
	Media 23,75	7,35	69,1
30×10^{-5} M.	23.5	3.9	89
	24	5.6	76
	Media 23,75	4,75	82,5
70×10^{-5} M.	24	0	100
	23	0	100
	Media 23,5	0	100
100×10^{-5} M.	24	0	100
	24	0	100
	Media 24	0	100

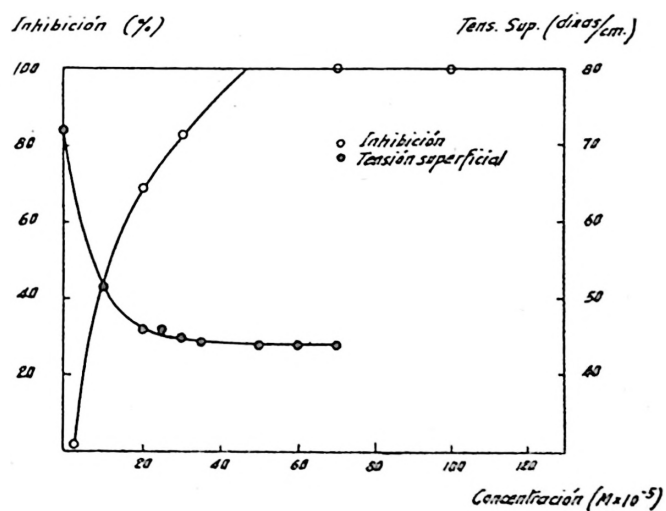


Figura 6

Efecto de CNa al 1 % sobre los diagramas de tensión superficial e inhibición de la utilización de glucosa exterior por el bromuro de didecil-dimetil-amonio.

te inefectivo por sí mismo (50), constituye una verdadera contraprueba para la hipótesis micelar.

INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE CÉLULAS

Se ha estudiado la influencia de la concentración celular sobre la cantidad de glucosa tomada del medio exterior, sin inhibidor y en presencia de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio. En el cuadro XII y en la fig. 7 se representan los resultados obtenidos.

CUADRO XII

Influencia de la concentración celular sobre la inhibición de la absorción por el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio en la levadura

*Concentración de inhibidor 11×10^{-5} M.
Glucosa inicial 5 %*

Concentración de levadura	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
0,01 m./ml.	10	0	100
	11	1	91
	Media 10,5	0	100
0,03 m./ml.	25	16	36
	28	16	43
	Media 26,5	16	38
0,04 m./ml.	36	26	28
	37	27	27
	Media 36,5	26,5	28
0,045 m./ml.	38	31	18
	39	32	18
	Media 38,5	31,5	18
0,06 m./ml.	mayor de 40	40	—
	mayor de 40	40	—
	Media —	40	—

Como ya habían encontrado HOPKINS y ROBERTS (24), la absorción anaeróbica de glucosa es sensiblemente proporcional a la concentración celular. En presencia del compuesto de amonio cuaternario sigue cumpliéndose el mismo comportamiento.

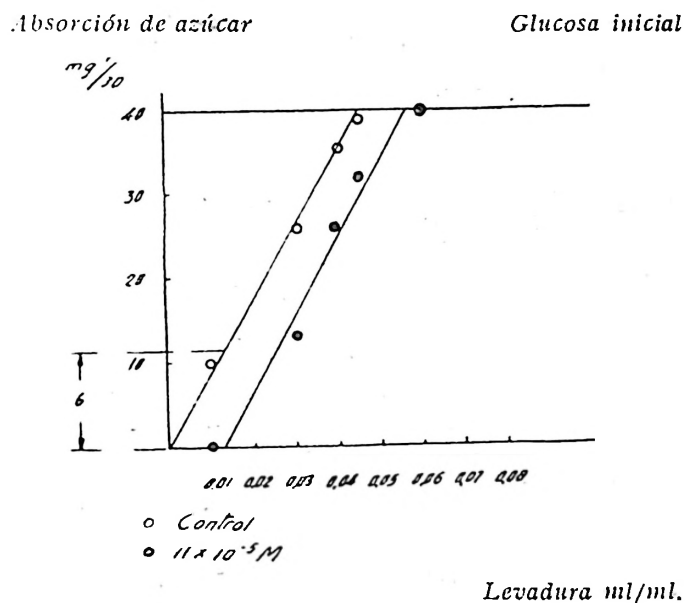


Figura 7

Influencia de la concentración de levadura en la utilización de glucosa exterior.

Si a es la glucosa absorbida en un tiempo determinado y s es la concentración celular, se tendrá que

$$a = k \cdot s \quad (I)$$

siendo k constante. Correlativamente, en presencia del compuesto de amonio cuaternario podrá obtenerse

$$a' = k' \cdot s - b \quad (II)$$

Prácticamente, $k = k'$. La ordenada en el origen b determina la concentración celular mayor para la que se suprime la absorción.

Para la inhibición, de (I) y (II) se obtiene

$$I = \left(\frac{a - a'}{a} \right) \cdot 100 = \frac{b \cdot 100}{k \cdot s} \quad (\text{III})$$

Para una cantidad fija de inhibidor las inhibiciones resultan inversamente proporcionales a las concentraciones de levadura.

Las ecuaciones (I), (II) y (III) deben ser sólo aproximadas. En efecto, los valores del Cuadro XII se han obtenido en ex-

Absorción de azúcar

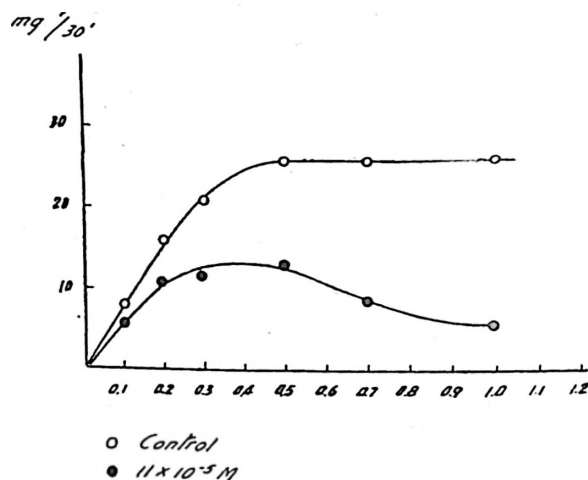


Figura 8

Influencia de la concentración en la absorción.

periencias de 30 minutos de duración y, en consecuencia, la absorción se ha llevado a cabo bajo distintas concentraciones de azúcar. Como se verá más adelante, k y k' no son independientes de la concentración de glucosa y ni tan sólo se hallan igualmente influenciadas por la misma (fig. 8). Por lo tanto, la verdadera expresión de las ecuaciones anteriores será

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{dx}{dt} = ks, \quad (\text{I}')$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{dx'}{dt} = ks - b, \quad (\text{II}')$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} . I = c . \frac{1}{s} \quad (\text{III}')$$

Entonces k será constante e igual a k' . Esto es, solamente para una condición límite en la que las experiencias deberían tener una duración suficientemente pequeña como para poder considerar constante la concentración de glucosa.

FIJACIÓN POR LAS CÉLULAS VIVAS

La pronunciada actividad capilar de los compuestos de amonio cuaternario lleva a considerar la posibilidad de que se fijen sobre la célula en elevada proporción. El hecho de que la inhibición no sea independiente de la concentración celular, debe ser una consecuencia de este fenómeno.

Se han llevado a cabo determinaciones de la cantidad de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio tomado por la levadura. Con diversas concentraciones iniciales del compuesto de amonio cuaternario fueron mantenidas a 30° C. por espacio de 1 hora, suspensiones de levadura de 9 y 20 ml./l. de sedimento. Luego de centrifugar, con el método de EPTON se determinó el contenido en amonio cuaternario del sobrenadante. Los resultados obtenidos se consignan en el Cuadro XIII y en la fig. 9.

Se encuentra un valor de saturación de las células para un nivel relativamente alto de la concentración de amonio cuaternario. En los ensayos de inhibición del metabolismo glucídico las concentraciones empleadas de inhibidor se hallan muy por debajo de dicho nivel de saturación.

La inhibición de la absorción de glucosa debe ir asociada a la fijación de inhibidor sobre la célula bajo la forma de un complejo reversible. Los valores consignados en el Cuadro XIII y en la fig. 9 ponen de manifiesto la existencia de un equilibrio entre la concentración celular, la concentración de inhibidor en el medio y la concentración de inhibidor fijado a las células.

ROTHSTEIN y LARRABEE (45) obtuvieron un resultado parecido para la inhibición del uranilo. Dichos autores describen el equilibrio entre uranilo y células de levadura aplicando la ley de acción de masas. Para reconocer la naturaleza química de los *loci* de la membrana celular que formarían el complejo con el ión uranilo, ROTHSTEIN, FRENKEL y LARRABEE (46) efectuaron un extenso estudio de la constante de disociación de los complejos que forma dicho ión con una serie de sustancias

CUADRO XIII

Cantidad de compuesto de amonio cuaternario fijado por la levadura

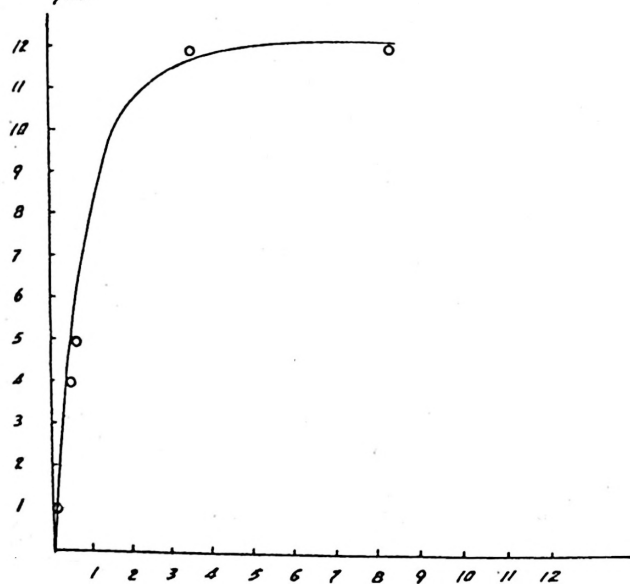
Concentración inicial	Concentración final	Levadura ml/l.	Mols fijados por ml. de levadura
192×10^{-3} M.	83×10^{-3} M.	9	12×10^{-3} M.
144×10^{-3} M.	35×10^{-3} M.	9	12×10^{-3} M.
96×10^{-3} M.	6×10^{-3} M.	20	4×10^{-3} M.
48×10^{-3} M.	7×10^{-3} M.	9	5×10^{-3} M.
24×10^{-3} M.	1×10^{-3} M.	20	$1,1 \times 10^{-3}$ M.

químicas. Como resultado de este estudio, los referidos autores concluyen que el ión uranilo ejerce la inhibición combinándose reversiblemente con grupos situados en la superficie celular del tipo de los polimetafosfatos.

Como señalan ROSENBERG y WILBRANDT (44), la formación

Inhibición (%)

Mols. 10^{-5} /ml.



Concentración ($\times 10^{-3}$ M)

Figura 9

Fijación del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio por la levadura

del complejo uranilo-célula no puede referirse a una reacción homogénea y, en consecuencia, la ley de acción de masas no puede ser aplicada.

El equilibrio entre los cationes de amonio cuaternario y la célula de levadura puede ser descrito mediante una isoterma de adsorción. La curva de la figura 9 se adapta bastante bien a la ecuación de Freundlich.

$$x = k (a - x)^{1/n}$$

Efectivamente, tomando logaritmos de ambos miembros de la ecuación anterior, se tiene

$$\log. x = 1/n \cdot \log (a - x) + k$$

Con los datos experimentales correspondientes a concentraciones de inhibidor inferiores al nivel de saturación, pueden calcularse los valores de $\log x$ y $\log (a - x)$ (Cuadro XIV). La representación gráfica de los mismos se ajusta bastante bien a la ecuación anterior y pone de manifiesto que $1/n$ es independiente de la concentración inicial de amonio cuaternario, como exige la ley de la isoterma de adsorción (fig. 10).

La isoterma de adsorción sólo se cumple en ausencia de absorción o reacción química del compuesto absorbido. Por tanto, el hecho de que la fijación del compuesto de amonio cuaternario por las células de levadura siga dicha ley, permite concluir que, por debajo del nivel de saturación, la cantidad de inhibidor que penetra en la célula debe ser muy pequeña frente a la que se fija sobre la membrana celular.

CUADRO XIV

*Fijación del compuesto de amonio cuaternario por la célula de levadura.
Datos para la comprobación de la ley de Freundlich.*

$a - x$	$\log (a - x)$	x	$\log x$	ml/l.
109×10^{-5}	— 2,96	83×10^{-5}	— 3,08	9
109	— 2,96	35	— 3,46	9
40	— 3,40	6	— 4,22	9 (")
41	— 3,38	7	— 4,15	9
10	— 4,00	1	— 5,00	9 (")

(") Calculado del correspondiente valor de S (ml/l.) = 20.

Si la tensión superficial en la interfase medio/membrana celular fuese igual a la de la interfase medio/aire, la cantidad

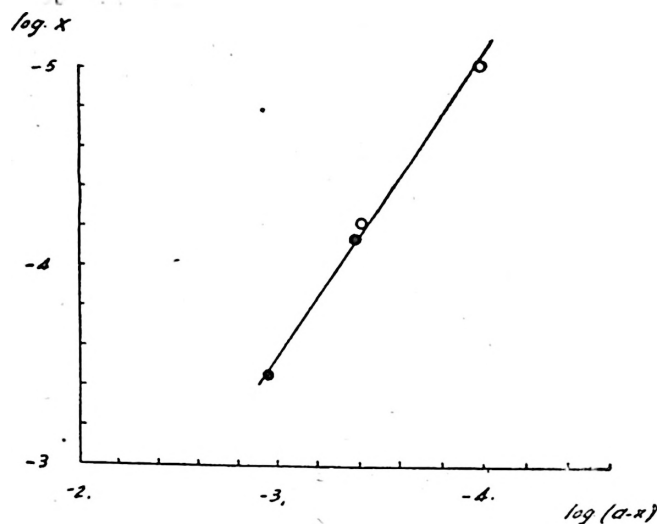


Figura 10

Fijación del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio.

de inhibidor fijada por las células vendría determinada por la ecuación de Gibbs

$$c_s = -c/RT \cdot d\sigma/dc$$

en la que c es la concentración total de inhibidor, R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta y $d\sigma/dc$ la variación de la tensión superficial en función de c .

Para las sustancias tensoactivas que siguen la ley de Szyskowsky

$$\sigma = \sigma_0 \left[1 - B \ln \left(1 + \frac{c}{A} \right) \right]$$

se tiene que

$$\frac{d\sigma}{dc} = -B\sigma_0 \ln \frac{cA}{A+c} \cdot \frac{1}{A}$$

y llevando este valor a la ecuación de GIBBS,

$$c_s = \frac{c}{RT} B \sigma_0 \ln \frac{c}{A + c} \simeq k \frac{c}{A + c}$$

relación idéntica a la isoterma de Langmuir.

En realidad la tensión superficial en la interfase medio/membrana celular nos es desconocida y los diagramas de tensión superficial de los compuestos de amonio cuaternario no siguen la ley de Szyskowsky. Por tanto, las relaciones anteriores sólo pueden aceptarse como expresiones aproximadas del verdadero transcurso de la isoterma de adsorción. Sin embargo, la forma de la última ecuación es muy interesante, porque fija los siguientes hechos:

1. La tensión superficial mínima depende de un valor de saturación.
2. El valor de saturación disminuye al crecer A . Ya vimos anteriormente que, al formarse micelas, se modifica c según la ecuación

$$c = c_0 \left[1 + \gamma \left(\frac{1}{z} - 1 \right) \right]$$

lo que también puede expresarse substituyendo A por

$$A' = \frac{A}{1 - \gamma \left(1 + \frac{1}{z} \right)}$$

Entonces, si a un nivel de concentración determinado tiene lugar la formación de micelas, el valor de saturación disminuirá, obteniéndose un mínimo en la curva de tensión superficial.

Aplicando la ley de acción de masas se obtiene un resultado parecido desde un punto de vista exclusivamente formal. Sin embargo, importa tener en cuenta que las constantes cobran aquí distinto valor y sentido.

Las características de la isoterma de adsorción permitirían un análisis termodinámico de la posible naturaleza del complejo que el catión de amonio cuaternario puede formar sobre la superficie celular. No obstante, como también señalan ROSENBERG y WILBRANDT (44) a propósito de los trabajos de ROTHSTEIN y su escuela, cabría señalar también aquí que no resulta satisfactorio comparar la tendencia a la disociación de un sistema

Inhibición (%)

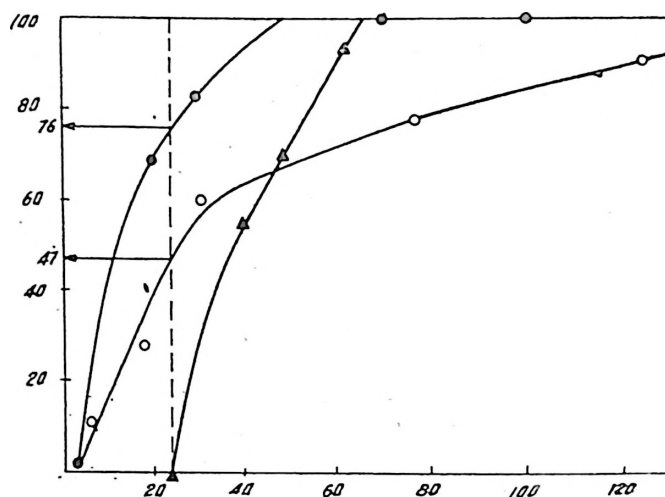


Figura 11

Selectividad sobre membrana de las formas micelar e iónica del bromuro de didecil-dimetil-amonio.

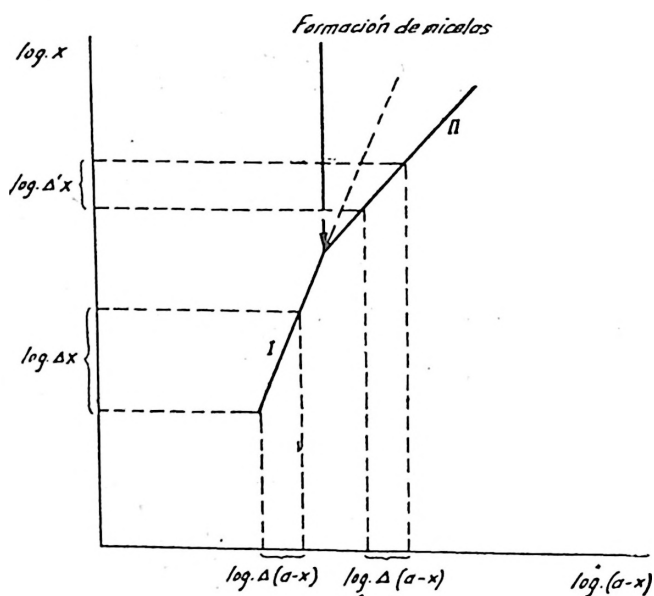


Figura 12

Isotermas teóricas de la adsorción de iones y micelas de bromuro de didecil-dimetil-amonio por la levadura.

formado por un complejo y unos productos de disociación en un medio acuoso, con otro sistema en el que un producto de disociación y el complejo se hallan fijados en la membrana celular. En los inhibidores que presentan adsorción sobre la super-

ficie celular, la concentración realmente eficaz es la acumulada sobre la membrana y ordinariamente diferirá mucho de la que se obtendría a partir de la cantidad de sustancia disuelta en el medio. Los cambios en esta última no se corresponderán con una variación proporcional de la cantidad de sustancia a nivel de la membrana celular. Como ya hemos visto, el equilibrio entre concentración en el medio y en la interfase puede ser descrito por relaciones del tipo de las isothermas de Langmuir y Freundlich.

Las curvas anómalas de inhibición debidas a la formación de micelas, tendrán dos isothermas: una para la forma micelar y otra para la forma iónica o molecular. Además, la curva obtenida para el bromuro de didecil-dimetil-amonio indica que el equilibrio del inhibidor entre el medio y la membrana se halla más desplazado hacia el primero en la forma micelar que en la iónica (fig. 11). En la figura 12 se representa la forma teórica de las isothermas de adsorción de los iones y de las micelas del referido compuesto de amonio cuaternario. Para un mismo incremento de concentración en el medio, se aumenta la concentración efectiva sobre la superficie del microorganismo en proporción muy diferente en uno y otro caso.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR

Se ha determinado la influencia de la concentración de azúcar sobre la utilización anaeróbica de glucosa exterior por una suspensión de 0,03 m./ml. de levadura en agua destilada y en presencia de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio 11×10^{-5} M. Los resultados obtenidos se representan en el cuadro XV y en la figura 8.

Como ya señalaron RUNNSTRÖM, SPERBER y FELLER (51), se encuentra un nivel de saturación para concentraciones de glucosa exterior relativamente bajas. Los 26 mg. constituyen el límite para la glucosa absorbible por 0,24 ml. de levadura, a 30° C. y en media hora (fig. 8).

Por encima del valor de saturación, con el compuesto de amonio cuaternario, la glucosa absorbida, no sólo no aumenta, sino que disminuye sensiblemente. A partir de dicho nivel parece como si el aumento de glucosa estimulara el efecto del inhibidor (fig. 8).

HOPKINS y ROBERTS (24) señalaron que la fermentación de la glucosa por células de levadura seguía la ecuación de Michaelis-Menten. Posteriormente, ROTHSTEIN y HURWITZ (47) y ROTHSTEIN (50) han obtenido resultados que ratifican esta conclusión. Para concentraciones de glucosa situadas por debajo

del nivel de saturación, nuestros valores también permiten comprobar este resultado (fig. 13).

CUADRO XV

*Influencia de la concentración de azúcar en la inhibición de la absorción.
Cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio
 11×10^{-3} M.*

Concentración de glucosa	mg. de glucosa absorbidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Con inhibidor	Sin inhibidor	
$5,56 \times 10^{-3}$ M.	7	9	22
	5	7	29
	Media 6	8	25
$11,1 \times 10^{-3}$ M.	11	15,5	35
	11	16,5	39
	Media 11	16	37,5
$16,7 \times 10^{-3}$ M.	12	21	43
	12	21	43
	Media 12	21	43
$27,8 \times 10^{-3}$ M.	13	26,5	51
	13	25,5	49
	Media 13	26	50
$38,9 \times 10^{-3}$ M.	9	26	58
	9	26	58
	Media 9	26	58
$55,6 \times 10^{-3}$ M.	5	26	81
	7	26	73
	Media 6	26	77

El comportamiento cinético pone de manifiesto que el compuesto de amonio cuaternario actuaría como un inhibidor no competitivo para el intervalo de concentraciones de glucosa que se adaptan a la teoría de Michaelis-Menten. Para concentraciones superiores al nivel de saturación sigue una ecuación más

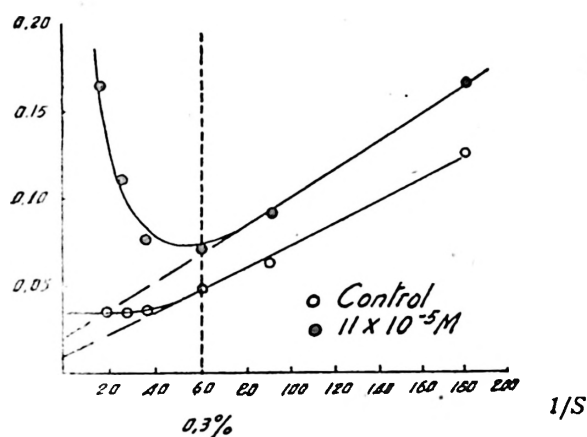


Figura 13

Cinética de la inhibición de la utilización de glucosa exterior por el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencilamonio.

III. Tensoactivo + Cl_2Fe ($1.8 \cdot 10^{-4}$ M/l. de Cl^-).—IV. Tensoactivo + ClNa ($1.8 \cdot 10^{-4}$ M/l. de Cl^-).

compleja. La forma detallada y significación de dicha ecuación es desconocida, pero en su conjunto expresa interacción entre sustrato e inhibidor y no en el sentido de competencia, sino en el de sinergia (fig. 13).

INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA ENDÓGENA

La fermentación alcohólica endógena espontánea en la levadura es extraordinariamente pequeña (48, 49, 54, 55, 57). Al parecer, el glucógeno de las células de levadura no puede ser fermentado más que muy lentamente durante una prolongada anaerobiosis (52). Sin embargo, nosotros hemos podido conseguir una fermentación endógena en la levadura después de haber mantenido a una suspensión de células durante algún tiempo en una solución de glucosa (38, 40).

La técnica seguida ordinariamente consiste en preparar una suspensión de levadura comprimida al 5 % en una solución de glucosa de la misma concentración. Esta suspensión se mantiene por espacio de 1 h. en un baño a 30°C . Durante todo

este tiempo se agita, haciendo pasar a su través una fuerte corriente de aire. La levadura incubada se lava dos veces, se coloca a pH 3,5 con ClH 0,1 N. y se suspende hasta un valor de sedimento de 0,03 ml./ml. (14.253 mg./ml. en peso seco). Con la técnica ordinaria de WARBURG se miden los microlitros de anhídrido carbónico desprendidos en 1/2 h. a 30° C. después de haber desplazado el aire con nitrógeno debidamente purificado (39).

CUADRO XVI

Acción del cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura

Concentración de inhibidor	μl. de CO ₂ desprendidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
28 × 10 ⁻⁵ M.	18	19	—
	23	20	—
	17	20	—
	Media 19	19	0
45 × 10 ⁻⁵ M.	36	24	33
	46	28	39
	Media 41	26	37
56 × 10 ⁻⁵ M.	37	—	—
	36	13	64
	36	23	36
	Media 36	18	50
73 × 10 ⁻⁵ M.	53	8	85
	54	12	78
	53	10	81
	Media 53	10	81

En un trabajo anterior estudiamos la acción del cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura (39). En los Cuadros XVI, XVII y XVIII y en las figuras 3, 5 y 4 se consignan los resultados obtenidos para los otros tres compuestos de amonio cuaternario. Todos ellos se muestran efectivos y la inhibición crece muy rápidamente desde que el producto empieza a actuar, siguiendo un curso aproximadamente lineal.

CUADRO XVII

Acción del bromuro de didecil-dimetil-amonio sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura

Concentración de inhibidor	μ l. de CO ₂ desprendidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
24 $\times 10^{-3}$ M.	65	63	5
	64	66	—
	63	—	—
	Media 64	64	0
40 $\times 10^{-3}$ M.	—	15	—
	43	—	—
	30	18	47
	Media 36,5	16,5	55
49,5 $\times 10^{-3}$ M.	37	—	—
	—	13	—
	30	7	77
	Media 33,5	10	70
62 $\times 10^{-3}$ M.	52	3	94
	52	3	94
	—	—	—
	Media 52	3	94

INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR.

Cuando un inhibidor enzimático penetrante y estrictamente inespecífico se concentra por adsorción sobre la superficie celular, siempre podrá llegarse a una concentración para la cual serán inhibidos los procesos enzimáticos de superficie sin que sea afectado ningún proceso endocelular. La adsorción habrá conferido al inhibidor cierta selectividad sobre membrana.

En los inhibidores sin actividad capilar existe la posibilidad de que la propia adsorción sea consecuencia de una selectividad sustantiva sobre la superficie celular. Sin embargo, es evidente que en las sustancias tensoactivas la adsorción es consecuencia de propiedades físico-químicas de su molécula com-

pletamente genéricas y no necesariamente ligadas al efecto inhibidor.

CUADRO XVIII

Acción del bromuro de cetil-trimetil-amonio sobre la fermentación alcohólica endógena en la levadura

Concentración de inhibidor	μ l. de CO ₂ desprendidos en 1/2 h. a 30° C.		Inhibición %
	Sin inhibidor	Con inhibidor	
$38,5 \times 10^{-3}$ M.	48	52	—
	50	47	6
	48	—	—
	Media 49	49	0
55×10^{-3} M.	48	39	19
	48	45	6
	48	40	17
	Media 48	41	15
$137,5 \times 10^{-3}$ M.	33	15	55
	39	17	56
	35	16	54
	Media 36	16	55
220×10^{-3} M.	56	9	84
	57	—	—
	56	7	87,5
	Media 56	8	86

Cabe admitir que una sustancia determinada actúa sobre el paso de glucosa a través de la membrana cuando es capaz de inhibir la absorción sin afectar a la fermentación alcohólica endógena. Sobre este criterio nosotros hemos establecido un procedimiento general para la discriminación del efecto sobre membrana en los inhibidores de la absorción de glucosa por la levadura (39). La acción sobre membrana puede ser expresada por la mayor inhibición de la utilización de glucosa exterior conseguida con la máxima concentración de inhibidor que no afecte a la fermentación endógena. Dicho valor puede referirse en tantos por ciento del mayor grado de inhibición de la absorción que sea posible conseguir. En el Cuadro XIX se consig

nan los valores de selectividad sobre membrana obtenidos para los cuatro compuestos de amonio cuaternario. Como era posible prever teóricamente, todos ellos ponen de manifiesto un elevado índice de inhibición de la transferencia de glucosa a través de la membrana celular.

CUADRO XIX

Selectividad sobre membrana

Compuesto	Inhibición máxima de la absorción	Inhibición mayor sin efecto sobre la fermentación endógena	Selectividad sobre membrana
Cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio	100	82	82
Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio	100	98	98
Bromuro de didecil-dimetil-amonio (forma iónica)	100	76	76
Bromuro de didecil-dimetil-amonio (forma micelar)	100	48	48

A la concentración en la que cualquiera de los compuestos estudiados de amonio cuaternario empieza a actuar sobre los sistemas endógenos, la cantidad de inhibidor que ha penetrado en la célula debe ser despreciable frente a la que se halla concentrada en la superficie. Si fuese posible conseguir una distribución homogénea del inhibidor, probablemente resultaría tan activo o quizá más sobre los sistemas endocelulares que sobre los de transporte de glucosa a través de la membrana.

La concentración de glucosa utilizada en la discriminación del efecto sobre membrana cae dentro del límite hasta el que se cumple la ecuación de Michaelis-Menten. En el Cuadro XIX y en la figura 11 se pone de manifiesto una diferente selectividad sobre membrana para los iones libres y para las micelas de bromuro de didecil-dimetil-amonio. Prescindiendo de la acción del cloruro sódico, la selectividad sobre membrana de los iones libres sería de un 75 %, en tanto que para la forma micelar sólo alcanza un 47 %. Este resultado no permite sugerir nada con respecto a la permeabilidad relativa de las dos formas, puesto que en ambos casos la cantidad que ha penetrado por la célula debe ser despreciable frente a la que se ha fijado en la membrana. Tal diferencia sólo puede interpretarse en el sentido de que para la forma micelar el equilibrio expresado por la isoterma

de adsorción está mucho más desplazado hacia la fase exterior que en la forma iónica.

Si todos los compuestos de amonio cuaternario fuesen de suyo igualmente activos, la selectividad sobre membrana mostraría una completa correlación con su actividad capilar en la interfase medio/membrana celular. La tensión superficial en la interfase agua/aire debe diferir de la correspondiente en la interfase medio/membrana celular. Sin embargo, pueden considerarse suficientemente semejantes como para que, de existir la supuesta correlación entre selectividad sobre membrana y tensión superficial en una interfase, existiera también correlación con la tensión superficial en la otra.

La actividad capilar de los cuatro compuestos estudiados (Cuadro III) en la interfase agua/aire, no guarda ningún tipo de relación con su respectiva selectividad sobre membrana (Cuadro XIX). Este resultado permite sugerir que para una misma concentración efectiva sobre la superficie celular los sistemas que controlan el paso de glucosa a través de la membrana en la levadura son desigualmente influídos por cada una de las sustancias estudiadas.

La actividad superficial de los cuatro compuestos de amonio cuaternario no guarda tampoco ninguna relación con la actividad absoluta sobre la utilización de glucosa exterior, ni con la inhibición de la fermentación endógena (Cuadro III y Cuadro XX).

La actividad germicida de las cuatro sustancias estudiadas es muy parecida (Cuadro I) y alcanza concentraciones bastante superiores a las comprendidas en nuestras experiencias. De momento no parece verosímil una relación inmediata entre esta propiedad y la acción estudiada sobre el transporte de glucosa, en la que existen notables diferencias de uno a otro compuesto.

La selectividad sobre membrana de los inhibidores estudiados parece estar relacionada con la particular configuración de su estructura molecular. A este respecto, conviene hacer notar que las sustancias más activas, el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio y el cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio, son las únicas que tienen el grupo-bencilo. Estas sustancias no son tan sólo las de mayor selectividad, sobre membrana, sino también las de mayor actividad absoluta (Cuadro XX). También es interesante recordar que RAWLINS, SWEET y JOSLYN (42) señalaron igualmente la importancia de este grupo en la molécula de los compuestos de amonio cuaternario para la actividad germicida y que BAKER, HARRISON y MILLER (6) obtuvieron una mayor actividad de los compuestos con bencilo, en la inhibición de la respiración y de la fermentación de la glucosa por varios microorganismos.

CUADRO XX

Inhibición de la utilización de glucosa exterior y de la fermentación alcohólica endógena en la levadura.

Producto	Utilización de glucosa exterior		Fermentación endógena	
	Inhibición mínima	100 % de	Inhibición mínima	100 % de inhibición
Cloruro de di-isobutil-fenoxi-efoxi-etil-dimetil-bencil-amonio	2×10^{-3} M.	26×10^{-3} M.	22.5×10^{-3} M.	63×10^{-3} M.
Cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio	4×10^{-3} M.	29×10^{-3} M.	28×10^{-3} M.	85×10^{-3} M.
Bromuro de cetil-trimetil-amonio	24×10^{-3} M.	83×10^{-3} M.	40×10^{-3} M.	258×10^{-3} M.
Bromuro de didecil-dimetil-amonio	$2,5 \times 10^{-3}$ M.	150×10^{-3} M.	24×10^{-3} M.	67×10^{-3} M.

RAWLINS, SWEET y JOSLYN (42) señalaron también que existe una longitud crítica de la cadena alquílica por encima y por debajo de la cual disminuye el poder germicida de los compuestos de amonio cuaternario. A este respecto, es preciso tener presente que los dos compuestos más activos sobre membrana tienen una cadena lateral prácticamente de la misma longitud de 15 Å, en tanto que de los dos restantes uno tiene una longitud de 19 Å y el otro de 11 Å.

Es muy probable que la existencia de la referida longitud crítica de la cadena lateral esté vinculada al fenómeno de la formación de micelas. La fijación sobre la membrana crecerá al aumentar la longitud de la cadena lipófila, y con ello aumentará también la actividad fisiológica de la sustancia. Sin embargo, la tendencia a formar micelas también se verá incrementada. Como las micelas son menos activas o se adsorben menos que las moléculas o iones libres, cuando la tendencia a formar micelas predomine sobre el aumento de la actividad capilar, la acción fisiológica decrecerá. De este modo se podrá encontrar una cadena lateral con un número de carbonos óptimo para la actividad.

COMPORTAMIENTO DE LOS CUATRO COMPUESTOS ESTUDIADOS

El cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio presenta una clara inhibición del paso de glucosa a través de la membrana celular. Concentraciones que apenas afectan a la fermentación alcohólica endógena suprimen casi totalmente la utilización de glucosa exterior. La inhibición de la absorción crece algo más rápidamente cuando el producto empieza a actuar y luego sigue aumentando con menor rapidez de un modo prácticamente lineal. La inhibición de la fermentación alcohólica endógena sigue un comportamiento análogo. Sin embargo, el crecimiento lineal es más rápido en la inhibición de la absorción que en la del metabolismo endógeno.

La concentración de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio que suprime totalmente la absorción de glucosa es aproximadamente 1/15 de la que las células son capaces de fijar.

El cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio presenta una pronunciada acción selectiva sobre membrana. Prácticamente puede conseguirse inhibir totalmente el paso de glucosa a través de la membrana para concentraciones que no afectan al sistema endógeno.

La inhibición de la absorción crece de un modo casi completamente lineal desde las mínimas concentraciones eficaces.

La inhibición del metabolismo endógeno sigue un curso semejante. La curva de utilización tiene una pendiente mayor que la correspondiente a la fermentación endógena. Como en el caso anterior, se sugiere que los mecanismos de inhibición deben ser distintos.

El bromuro de cetil-trimetil-amonio manifiesta un cambio notable de comportamiento con respecto a los dos compuestos anteriores. La selectividad sobre membrana es relativamente más baja. Se empieza a modificar el metabolismo endógeno anaeróbico a concentraciones que sólo producen una inhibición del 30 al 40 % de la absorción.

La curva de inhibición de la absorción crece rápidamente y de forma casi lineal. Recuerda las curvas correspondientes de los dos compuestos anteriormente estudiados, particularmente la del cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio. En cambio, la inhibición de la fermentación endógena es bastante distinta. Después de una primera porción de crecimiento relativamente rápido, sigue aumentado más lentamente que la inhibición de la absorción. Aquí se muestra particularmente claro el fenómeno ya señalado en los casos anteriores de que el paso de glucosa a través de la membrana es afectado por el inhibidor de modo distinto a como lo es el metabolismo endógeno anaeróbico. Al parecer, la cinética de los dos procesos difiere porque en el primer caso el sistema más sensible debe ser el de transporte a través de la membrana, el cual falta en el segundo. La curva de inhibición de la absorción debe ser equivalente a la curva de inhibición de la fermentación endógena más el factor membrana. Ambas son afectadas desigualmente al variar la concentración de inhibidor en el medio.

El bromuro de didecil-dimetil-amonio constituye un caso en cierto modo inverso al bromuro de cetil-trimetil-amonio. Es posible establecer una semejanza muy considerable entre la acción de esta sustancia sobre el metabolismo endógenos y la correspondiente de los dos primeros cuerpos estudiados. Esta semejanza no sólo comprende a la forma de la curva, sino incluso a los valores absolutos de concentración. Los tres compuestos de amonio cuaternario se muestran igualmente tóxicos para los sistemas enzimáticos comprendidos en la fermentación alcohólica endógena. Por el contrario, el efecto del bromuro de didecil-dimetil-amonio sobre la utilización de glucosa exterior es enteramente distinto. Empieza a actuar a concentraciones muy bajas y la inhibición crece casi linealmente pero con una pendiente menor que la que corresponde a la curva de su acción endógena. Esto es, un comportamiento inverso al de los demás compuestos. Además, a concentraciones del orden de las que empieza a actuar en el interior de la célula, existe un cambio

de pendiente notablemente acentuado. La inhibición sigue aumentando, pero bastante más lentamente, hasta el punto de cruzar la curva de inhibición del metabolismo endógeno anaeróbico. La supresión completa de la utilización de glucosa exterior sólo se consigue para concentraciones más de dos veces superiores a la necesaria para inhibir totalmente el metabolismo endógeno.

El hecho de que este compuesto de doble cadena alquílica permita que las células de levadura continúen tomando glucosa del exterior a concentraciones que suprimen la totalidad de la fermentación endógena debe ser consecuencia, por una parte, de que sobre la penetración de glucosa en la célula actúa la forma micelar, mientras que sobre los procesos endógenos lo hace la forma iónica y de otra, a que la penetración es menos sensible a las micelas que la glucogenolisis a los iones. Como el nivel de glucosa endocelular es prácticamente nulo (50), todo el metabolismo endógeno anaeróbico debe proceder del glucógeno, y por lo tanto, al suprimirse la glucogenolisis, aunque todavía pueda glucolizarse, la producción endógena de anhídrido carbónico quedará completamente inhibida. En cambio, la absorción y consumo de glucosa exterior podrá todavía tener lugar. Tal interpretación está de acuerdo con el hecho de que al impedir la formación de micelas deja de presentarse el fenómeno. La selectividad sobre membrana de los iones libres es mucho mayor que la de las micelas, como ya se ha visto anteriormente.

Los resultados obtenidos para los cuatro compuestos de amonio cuaternario muestran que, en general, estas sustancias actúan primariamente sobre la membrana celular inhibiendo el paso de glucosa. Por encima de cierta concentración, actúan luego sobre los sistemas endocelulares comprendidos en el metabolismo glucídico anaeróbico. De hecho, su modo de acción es el de inhibidores enzimáticos penetrantes e inespecíficos. La acción selectiva sobre los procesos de transferencia a través de la membrana deberá ser consecuencia de las propiedades físico-químicas que condicionan su elevada adsorción a nivel de la superficie celular.

Resumen y conclusiones

En el presente trabajo se estudia el modo de acción de varios compuestos de amonio cuaternario sobre las células de levadura en relación con el transporte de glucosa a través de la membrana y su ulterior consumo en el interior de la célula.

Se describen las fórmulas de los compuestos utilizados y sus propiedades germicidas (Cuadro I). Las soluciones empleadas en los experimentos se titularon previamente con un lauril sulfato de sodio cristalizado y purísimo, siguiendo la técnica de EPTON (16) (Cuadro II).

En el Cuadro III se refieren los valores de tensión superficial absoluta

a 19° C. de soluciones 0,002 M. de los respectivos compuestos. Las determinaciones se llevaron a cabo con el método de Lecompte Du Noüy.

Se estudian los diagramas de tensión superficial, encontrándose que el bromuro de didecil-dimetil-amonio presenta una brusca discontinuidad en la pendiente de la curva para cierto nivel de concentración (Cuadro IV y fig. 1). De acuerdo con otros autores (2, 3, 10), se admite que la anomalía es consecuencia de la formación de micelas. Se sugiere que por encima de determinado valor crítico, la concentración verdadera vendrá determinada por

$$c = c_0 \left[1 + \gamma \left(\frac{1}{z} - 1 \right) \right]$$

siendo c_0 la concentración en iones libres, z el número de iones que constituyen cada micela y γ la fracción

$$\frac{\text{número de iones en las micelas}}{\text{número total de iones}}$$

Se establece el supuesto de que la formación de micelas a partir de iones o de moléculas libres tendrá lugar, probablemente, por la simultánea intervención de dos tipos de fuerzas: a) atracción mutua entre las cadenas parafínicas y b) atracción entre las moléculas de agua y los extremos fuertemente polares del soluto tensoactivo. La estabilidad de las micelas dependerá particularmente de la envuelta de hidratación originada por el segundo tipo de fuerzas.

El grado de hidratación de las micelas podrá ser influido por la presencia de iones inorgánicos o de determinadas sustancias orgánicas con grupos hidroxilo o amino. Se descarta la posibilidad de que la inflexión en el diagrama de tensión superficial esté originada por impurezas.

En los Cuadros V, VI y VII y en la fig. 2 se consigna el efecto de varios cloruros inorgánicos sobre el diagrama de tensión superficial del bromuro de didecil-dimetil-amonio. Los resultados obtenidos están de acuerdo con la previsión teórica y establecen que la inflexión de la curva de tensión superficial de este compuesto de amonio cuaternario puede ser suprimida añadiendo a la solución cloruro sódico al 1 %.

Se estudia el efecto de los cuatro compuestos de amonio cuaternario sobre la absorción de glucosa por levadura fresca de pan (*Saccharomyces cerevisiae*). Como se indica en otro trabajo (39), se sigue fundamentalmente el procedimiento empleado por ROTHSTEIN y LARRABEE (45). En los Cuadros VIII, IX y X y en las figuras 3, 4 y 5 se consignan los resultados obtenidos [para el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio véase (39)]. Todos ellos ponen de manifiesto una gran actividad inhibidora desde concentraciones muy pequeñas. La inhibición crece muy rápidamente y casi de forma lineal.

La inhibición de la absorción de glucosa por el bromuro de didecil-dimetil-amonio no crece proporcionalmente con la concentración (fig. 5): para ciertos valores de la misma se presenta un cambio muy pronunciado en la relación entre el grado de inhibición y la concentración de inhibidor. La anomalía se presenta al mismo nivel de concentración en el que tiene lugar la formación de micelas (fig. 1). Impidiendo la formación de micelas con cloruro sódico, la curva de inhibición del bromuro de didecil-dimetil-amonio toma una forma completamente normal (fig. 6). Este resultado permite suponer que la curva anómala de inhibición es también consecuencia de la formación de micelas.

Se ha estudiado la influencia de la concentración celular sobre la cantidad de glucosa tomada del medio exterior, sin inhibidor y en presencia de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio. En el Cua-

dro XII y en la figura 7 se representan los datos obtenidos. La absorción es sensiblemente proporcional a la concentración celular en presencia y en ausencia de inhibidor. Para una cantidad fija de inhibidor, las inhibiciones resultan inversamente proporcionales a las concentraciones de levadura. Se concluye que estos resultados sólo son válidos cuando la concentración de glucosa es prácticamente constante a lo largo de las experiencias.

Se han llevado a cabo determinaciones de la cantidad de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil amonio tomado por la levadura, con diversas concentraciones iniciales del compuesto. Los resultados obtenidos se consignan en el Cuadro XIII y en la fig. 9. Se encuentra un valor de saturación de las células para un nivel relativamente alto de la concentración de amonio cuaternario. Las cantidades de inhibidor que suprimen la absorción de glucosa se hallan muy por debajo de dicho nivel de saturación.

Se discute la significación teórica de la curva de la fig. 9. El equilibrio entre los cationes de amonio cuaternario y la célula de levadura se describe mediante la isoterma de Freundlich (fig. 10). Se concluye que por debajo del nivel de saturación, la cantidad de inhibidor que penetra en la célula debe ser muy pequeña frente a la que se fija sobre la membrana celular. La fijación de los compuestos de amonio cuaternario, de acuerdo con la isoterma de adsorción, permite prever las consecuencias de la formación de micelas.

Se admite que las curvas anómalas de inhibición tendrán dos isotermas: una para la forma micelar y otra para la forma iónica o molecular. La fig. 11 permite sugerir que el equilibrio del inhibidor entre el medio y la membrana se halla más desplazado hacia el primero en la forma micelar que en la iónica. En la fig. 12 se representa la forma teórica de las dos isotermas de adsorción. Para un mismo incremento de concentración en el medio, se aumenta la concentración efectiva sobre la superficie celular en proporción muy diferente en uno y otro caso.

Se estudia la influencia de la concentración de azúcar sobre la utilización anaeróbica de glucosa exterior en presencia de cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio. Los resultados obtenidos se representan en el Cuadro XV y en la fig. 8. Se encuentra un nivel de saturación por encima del cual, con el compuesto de amonio cuaternario, la glucosa absorbida no sólo no aumenta, sino que disminuye sensiblemente.

Se confirma que la absorción anaeróbica de glucosa por células de levadura sigue la ecuación de Michaelis-Menten (fig. 13). El compuesto de amonio cuaternario actúa como un inhibidor no competitivo para el intervalo de concentraciones de glucosa situadas por debajo del nivel de saturación.

Por previa incubación de las células de levadura en una solución de glucosa puede inducirse una considerable fermentación alcohólica endógena (38, 40). En los Cuadros XVI, XVII y XVIII y en las figs. 3, 5 y 4 se consignan los resultados obtenidos sobre el efecto de los compuestos de amonio cuaternario sobre la fermentación alcohólica endógena [para el cloruro de di-isobutil-fenoxi-etoxi-etil-dimetil-bencil-amonio, véase (39)]. Todos ellos se muestran efectivos y la inhibición crece muy rápidamente desde que el producto empieza a actuar, siguiendo un curso aproximadamente lineal.

Se admite que una sustancia determinada actúa sobre el paso a través de la membrana cuando es capaz de inhibir la absorción sin afectar a la fermentación alcohólica endógena (39). En el Cuadro XIX se consignan los valores de selectividad sobre membrana obtenidos para los cuatro compuestos de amonio cuaternario. De acuerdo con la previsión teórica, todos ellos ponen de manifiesto un elevado índice de inhibición de la transferencia de glucosa a través de la membrana celular. En el Cuadro XIX y en la fig. 11 se pone de manifiesto una diferente selectividad sobre membrana para los iones libres y para las micelas de bromuro de didecil-dimetil-amonio.

La actividad capilar de los cuatro compuestos estudiados (Cuadro III) no guarda ningún tipo de relación con su respectiva selectividad sobre membrana (Cuadro XIX). Los sistemas que controlan el paso de glucosa a través de la membrana en la levadura deben ser desigualmente influidos por cada una de las sustancias estudiadas.

La actividad superficial de los cuatro compuestos de amonio cuaternario no guarda ninguna relación con la actividad absoluta sobre la utilización de glucosa exterior, ni con la inhibición de la fermentación endógena (Cuadro III y Cuadro XX).

Paralelamente al poder germicida (42) y a la inhibición de la respiración y de la fermentación de la glucosa por varios microorganismos (6), los compuestos que poseen en su molécula el grupo bencilo son los que presentan mayor selectividad sobre membrana.

Como ya se había encontrado para el poder germicida (42), los dos compuestos más activos sobre membrana tienen prácticamente la misma longitud de la cadena lateral. Es muy probable que exista una longitud crítica del grupo lipófilo vinculada al fenómeno de la formación de micelas.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la curva de inhibición de la absorción debe ser equivalente a la curva de inhibición de la fermentación endógena más el factor membrana. Ambas son afectadas desigualmente al variar la concentración de inhibidor en el medio.

Tres compuestos de amonio cuaternario se muestran igualmente tóxicos para los sistemas enzimáticos comprendidos en la fermentación alcohólica endógena. El bromuro de cetil-trimetil-amonio es menos activo.

A concentraciones de bromuro de didecil-dimetil-amonio del orden de las que empieza a actuar en el interior de la célula, existe un cambio de pendiente notablemente acentuado en la curva de inhibición de la absorción. La supresión completa de la utilización de glucosa exterior sólo se consigue para concentraciones más de dos veces superiores a la necesaria para inhibir totalmente el metabolismo endógeno (fig. 5). Se admite que este hecho es consecuencia, por una parte, de que sobre la penetración de glucosa en la célula actúa la forma micelar, mientras que sobre los procesos endógenos lo hace la forma iónica. Por otra parte, la penetración de glucosa es menos sensible a las micelas que la glucogenólisis a los iones.

Los cuatro compuestos estudiados de amonio cuaternario actúan primariamente sobre la membrana celular inhibiendo el paso de glucosa. Por encima de cierta concentración, inhiben luego los sistemas endocelulares comprendidos en el metabolismo glucídico anaeróbico. De hecho, se comportan como verdaderos inhibidores enzimáticos, capaces de penetrar dentro de la célula y dotados de muy poca especificidad. La acción selectiva sobre la transferencia de glucosa a través de la membrana deberá ser consecuencia de la elevada concentración de inhibidor a nivel de la superficie celular.

Summary

Action of some ammonium quaternary compounds upon the glucose uptake in yeast

In the present work, a study is made of the mode of action of various quaternary ammonium compounds on yeast cells in relation to glucose transport through the membrane and its later consumption inside the cell.

Formulas and germicidal properties of the compounds used are described (table I). Solutions employed in the experiments were previously titrated with a crystallised and purified sodium sulphate lauril, according to Epton's technique (16) (table II).

In table III, absolute surface tension values at 19° C. are given for 0.002 M. solutions of the various compounds. Determinations were brought about by the Lecompte Du Nouy method.

Surface tension diagrams are studied, it being found that di-decyl-dimethyl-ammonium bromide shows a sharp discontinuity in the slope of the curve for a certain level of concentration (table IV and figure 1). As in other authors (2, 3, 10) it is admitted that the anomaly is a consequence of the micelle formation. It is suggested that apart from the determined critical value, the true concentration is determined by C_0 being the

$$c = c_0 \left[1 + \gamma \left(\frac{1}{z} - 1 \right) \right]$$

concentration of free ions, z the number of ions which constitute each micelle and γ the fraction.

$$\frac{\text{number of ions in the micelle}}{\text{total number of ions}}$$

It is supposed that the formation of micelles from free ions and molecules may take place by the simultaneous intervention of two types of forces: a) mutual attraction between paraffin chains and b) attraction between the water molecules and strongly polar extremes of the tenso-active solute. Stability of the micelles may depend particularly on the covering of hydration originated by the second type of force.

The degree of hydration of the micelles may be influenced by the presence of inorganic ions or of certain organic substances with hydroxyl or amine groups. The possibility that the inflection on the surface tension diagram is due to impurities may be set aside.

In tables V, VI and VII and in figure 2, is shown the effect of various inorganic chlorides on the surface tension diagrams of didecyl-dimethyl-ammonium bromide. Results obtained agree with the theoretical forecast and establish the fact that the inflection of the surface tension curve of this quaternary ammonium compound can be suppressed by adding 1 % sodium chloride to the solution.

A study is made on the effect of the four quaternary ammonium compounds on the absorption of glucose by fresh baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). As indicated in another publication (39), the procedure followed is fundamentally that of ROTHSTEIN and LARRABEE (45). In tables VIII, IX and X and in figures, 3, 4 and 5, the results obtained are shown (for di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride, see 39). All show a great inhibitory activity even in very low concentrations. Inhibition grows rapidly and almost linearly.

Inhibition of glucose absorption by di-decyl-dimethyl-ammonium bromide does not increase in proportion to the concentration (figure 5); for certain values of the same, a very pronounced change is shown in the relation between the grade of inhibition and the concentration of inhibitor. The anomaly presents itself at the same level of concentration as that at which micelle formation takes place (figure 1). When the formation of micelles is impeded by sodium chloride, the inhibition curve of didecyl-dimethyl-ammonium bromide shows a completely normal shape (figure 6). This result allows one to suppose that the anomalous inhibition curve is also a consequence of the formation of micelles.

Influence of cellular concentration on the quantity of glucose taken up from the external medium without inhibitor and in the presence of di-isobutyl,phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride has

been studied. The data obtained are presented in table XII and in figure 7. Absorption is appreciably proportional to the cellular concentration in the presence or absence of the inhibitor. For a fixed quantity of inhibitor, inhibitions are inversely proportional to the yeast concentrations. It is concluded that these results are only valid when the glucose concentration is almost constant throughout the experiments.

Determinations were brought about of the quantity of di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride taken up by yeast in various initial concentrations of the compound. Results obtained are shown in table XIII and figure 9. A saturation value of the cells for a relatively high value of the quaternary ammonium is found. The quantities of inhibitor which suppress glucose absorption are far below this saturation level.

The theoretical significance of the curve of figure 9 is discussed. Equilibrium between quaternary ammonium cations and the yeast cells is described by the Freundlich isotherm (figure 10). It is concluded that below saturation level, the quantity of inhibitor which penetrates the cell must be very slight compared to that fixed on the cellular membrane. Fixation of quaternary ammonium compounds according to isotherm adsorption permits one to forecast the consequences of micelle formation.

It is admitted that anomalous inhibition curves have two isotherms: one for the micellar form, and the other for the ionic or molecular form. Figure 11 permits us to suggest that inhibitor equilibrium between the medium and the membrane is more displaced towards the former in the micellar form than in the ionic form. In figure 12, the theoretical form is represented in the two adsorption isotherms. For a similar increase in concentration in the medium, the concentration effective for the cellular surface increases in very different proportions in each of the two cases.

The influence of sugar concentration on aerobic utilisation of exterior glucose in the presence of di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride is studied. Results obtained are presented in table XV and in figure 8. A saturation level is found above which, with the quaternary ammonium compound, absorbed glucose not only does not increase but markedly decreases.

It is confirmed that anaerobic absorption of glucose by yeast cells follows the equation of Michaelis-Menten (figure 13). The quaternary ammonium compound acts as a non-competitive inhibitor for the interval of glucose concentrations situated below saturation level.

By previous incubation of yeast cells in a glucose solution, a considerable endogenous alcoholic fermentation can be induced (38, 40). In tables XVI, XVII and XVIII and in figures 3, 4, 5, are shown the results obtained on the effect of quaternary ammonium compounds on endogenous alcoholic fermentation [for di-isobutyl-phenoxy-ethoxy-ethyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride see (39)]. All are shown to be effective and inhibition grows very rapidly when the product begins to act, following an approximately linear course.

It is admitted that a certain substance acts on the passage across the membrane when it is capable of inhibiting absorption without affecting endogenous alcoholic fermentation (39). In table XIX, are found values of selectivity on membrane obtained for the four quaternary ammonium compounds. As in the theoretical forecast, all show a high index of inhibition of glucose transfer across the cellular membrane. In table XIX and in figure 11, is shown a different selectivity on membrane for free ions and for the micelles, of didecyl-dimethyl-ammonium bromide.

Capillary activity of the four compounds studied (table II), shows no relation to their respective membrane selectivity (table XIX). The systems

which control the passage of glucose through the membrane in yeast must be unequally influenced by each of the substances studied.

Surface activity of the four quaternary ammonium compounds has no relation to the absolute activity on utilisation of exterior glucose, nor to the inhibition of endogenous fermentation (table III and table XX).

Parallel with their germicidal power (42) and their inhibition of respiration and glucose fermentation by various microorganisms (6), compounds which possess the benzyl group in their molecule are those which show most selectivity on membrane.

As had been found for germicidal power (42), the two compounds most active on membrane have practically the same length of side chain. It is very probable that there exists a critical length of the lipophil group linked to the phenomenon of micelle formation.

Results obtained permit one to suggest that the curve of absorption inhibition must be equivalent to the curve of inhibition of endogenous fermentation plus the membrane factor. Both are unequally affected on varying the concentration of inhibitor in the medium.

Three quaternary ammonium compounds are shown to be equally toxic for the enzymatic systems included in endogenous alcoholic fermentation. Cetyl-trimethyl-ammonium bromide is less active.

With didecyl-dimethyl-ammonium bromide at concentrations which begin to act in the interior of the cell a change of slope exists which is markedly accentuated by the curve of absorption inhibition. Complete suppression of exterior glucose utilisation is only reached for concentrations more than twice as great as that necessary to totally inhibit endogenous metabolism (figure 5). It is admitted that this is a consequence on the one hand of the fact that glucose penetration in the cell is acted upon by the micellar form, while on the other hand endogenous processes are acted upon by the ionic form. However, penetration of glucose is less sensitive to the micelles than the glucogenolysis to the ions.

The four quaternary ammonium compounds studied act primarily on the cellular membrane inhibiting the passage of glucose. Above a certain concentration, they later inhibit the endocellular systems of anaerobic glucidic metabolism. As a matter of fact, they behave as true enzymatic inhibitors capable of penetrating the cell and endowed with little specificity. Selective action on glucose transfer through the membrane must be a consequence of the high concentration of inhibitor at the level of cell surface.

Bibliografía

- (1) ALBERT, A. : *Lancet*, 2, 633, 1942.
- (2) ALEXANDER, A. E. : Some physicochemical factors influencing biological activity. Symposia, Butterworths Scientific Publications, London, 299, 1949.
- (3) ALEXANDER, A. E. : Uptake of soaps by synthetic particles and bacteria. Symposia, Butterworths Scientific Publications, London, 309, 1949.
- (4) ANSON, M. L. : *J. Gen. Physiol.*, 23, 239, 1939.
- (5) BAKER, Z. HARRISON, R. W. y MILLER, B. F. : *J. Exptl. Med.*, 74, 611, 1941.
- (6) BAKER, Z., HARRISON, R. W., y MILLER, B. F. : *J. Exptl. Med.*, 73, 249, 1941.

- (7) BAKER, Z., HARRISON, R. W., y MILLER, B. F. : *J. Exptl. Med.*, **74**, 621, 1941.
- (8) BECHER, P. : Principles of emulsion technology. Reinhold Publishing Corporation, N. Y., 1955.
- (9) BURDON, R. S. : Surface tension and the spreading of liquids. Cambridge Univ. Press., 1949.
- (10) COR, P. : Emulsions, mousses, détercion. Les phénomènes de surface. Dunod, Paris, 1955.
- (11) COWLES, P. B. : *J. Biol. and Med.*, **11**, 127, 1938.
- (12) DANIELLI, J. F. : Cell physiology and pharmacology. Elsevier publishing company, Inc. New York, 1950.
- (13) DOMAGK, G. : *Deut. med. Wochschr.*, **61**, 829, 1935.
- (14) DYAR, M. T., y ORDAL, E. J. : *J. Bact.*, **51**, 149, 1946.
- (15) DYAR, M. T. : *J. Bact.*, **53**, 498, 1947.
- (16) EPTON, S. R. : *Nature*, **160**, 795, 1947.
- (17) FISHER, K. C., y STERN, J. R. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **19**, 109, 1942.
- (18) FISHER, K. C., y HENRY, R. J. : *J. Gen. Physiol.*, **27**, 469, 1944.
- (19) FREY-WYSSLING, A. : Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Elsevier publishing company, Inc., New York, 1948.
- (20) HARTLEY, G. S. : Aqueous solutions of paraffin chain salts. Paris. Hertman et Cie., 1936.
- (21) HARTLEY, G. S. y RUNNICES, G. F. : *Proc. Roy. Soc. London*, **168** 420, 1938.
- (22) HOBER, R. : Physical chemistry of cells and tissues. J. & A. Churchill Ltd., London, 1947.
- (23) HOOGERHEIDE, J. C. : *J. Bact.*, **49**, 277, 1945.
- (24) HOPKINS, R. H., y ROBERTS, R. H. : *Biochem. Jour.*, **29**, 915, 1935.
- (25) JACOBS, W. A. : *J. Exptl. Med.*, **23**, 563, 1916.
- (26) KIVELA, E. W., MALLMANN, W. L., y CHURCHILL, E. S. : Physical action of surface-active cations upon bacteria. Soc. Am. Bact. Abst. of the 47th. Gen. Meet., p. 43, 1947.
- (27) KIVELA, E. W. : *J. Bact.*, **55**, 565, 1948.
- (28) KLEIN, M., y KARDON, Z. G. : *J. Bact.*, **54**, 243, 1947.
- (29) KÜHN, R. y BIELIG, H. J. : *Ber über wissenschaft. Biol.*, **73**, 1.080, 1940.
- (30) LAMANNA, C., y CAMPBELL, J. R. : *J. Bact.*, **65**, 596, 1953.
- (31) LAWRENCE, C. A. : The use of quaternary ammonium compounds in the dairq industry. N. Y. State Assoc. Milk Sanitarians 19th. Ann. Report, 177, 1946.
- (32) LAWRENCE, C. A. : *Acta médica orientalia*, **5**, 363, 1946.
- (33) LAWRENCE, C. A. : Surface-active quaternary ammonium germicides. Academic Press Inc. New York, 1950.
- (34) MILLER, B. F. BAKER, Z. y HARRISON, R. W. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **42**, 705, 1939.

- (35) MILLER, B. F., y BAKER, Z. : *Science*, **91**, 624, 1940.
- (36) MITCHELL, P. : Physical factors affecting growth and death. Bacterial Physiology. Ed. by C. H. Werkman and P. W. Wilson. Academic Press Inc. New York, 127, 1951.
- (37) ORDAL, E. J., y BORG, A. F. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **50**, 332, 1942.
- (38) PARÉS, R. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 71, 1956.
- (39) PARÉS, R. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 193, 1956.
- (40) PONZ, F., y PARÉS, R. : 3ème Cong. Intern. Biochim., 109, Bruxelles. *Rev. esp. Fisiol.*, **11**, 254, 1955.
- (41) RAHN, O. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **62**, 2, 1946.
- (42) RAWLINS, A. L., SWEET, L. A., y JOSLYN, D. A. : *Jour. of the American Pharmaceutical Assoc., Scient. Ed.*, **32**, 11, 1943.
- (43) RESSUGGAN, R. : *Dairy Industries*, **12**, 443, 1947.
- (44) ROSENBERG, T., y WILBRANDT, W. : *Internat. Rev. Cyt.*, **1**, 65, 1952.
- (45) ROTHSTEIN, A., y LARRABEE, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**, 247, 1948.
- (46) ROTHSTEIN, A., PRENKEL, A., y LARRABEE, C. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**, 261, 1948.
- (47) ROTHSTEIN, A., y HURWITZ, L. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **37**, 57, 1951.
- (48) ROTHSTEIN, A., y BERKE, H. : *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **36**, 195, 1952.
- (49) ROTHSTEIN, A. y BERKE, H. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **31**, 559, 1952.
- (50) ROTHSTEIN, A. : *Protoplasmatología*, **II**, 87, 1954.
- (51) RUNNSTROM, J., SPERBER, E., y FELLER, W. : *Die Naturwiss.*, **26**, 547, 1938.
- (52) SCOTT, G. T., JACOBSON, M. A. y RICE, M. E. : *Arch. Biochem.* **30**, 282, 1951.
- (53) SEVAG M. G., y ROSS, O. A. : *J. Bact.*, **48**, 677, 1944.
- (54) SPIEGELMAN, S., y NOZAWA M. : *Arch. Biochem.*, **6**, 303, 1945.
- (55) STIER, T. J. B., y STANNARD, J. N. : *J. Gen. Physiol.*, **19**, 461, 1936.
- (56) WILLS, E. D. : *Biochem. Jour.*, **57**, 109, 1954.
- (57) WINZLER, R. J., y BAUMBERGER, J. P. : *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **12**, 183, 1938.
- (58) WYSS, O. : Chemical factors affecting growth and death. Bacterial Physiology. Ed. by C. H. Werkman and P. W. Wilson. Academic Press Inc. New York, 1951.